

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

THAÍS BIASUZ

**OBTENÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus* MICROENCAPSULADO EM  
CARRAGENA COM COMBINAÇÃO PROTEICA E APLICAÇÃO EM SALAME  
TIPO MILANO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEDIANEIRA

2018

THAIS BIASUZ

**OBTENÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus* MICROENCAPSULADO EM  
CARRAGENA COM COMBINAÇÃO PROTEICA E APLICAÇÃO EM SALAME  
TIPO MILANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná– UTFPR, Câmpus Medianeira/Campo Mourão, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Canan  
Coorientadora: Profa. Dra. Marinês P. Corso

MEDIANEIRA  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B579o

Biasuz, Thais

Obtenção de espécies de *Lactobacillus* microencapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em salame tipo milano. / Thais Biasuz – 2018.

79 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Canan

Coorientadora: Profa. Dra. Marinês P. Corso

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira/Campo Mourão, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Farelo de arroz. 2. Proteína 3. Alimentos – Dissertações. I. Canan, Cristiane orient. II. Corso, Marinês P. coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira  
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos CRB 9/1219



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **OBTENÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus* MICROENCAPSULADO EM CARRAGENA COM COMBINAÇÃO PROTEICA E APLICAÇÃO EM SALAME TIPO MILANO**

Por

**THAÍS BIASUZ**

Essa dissertação foi apresentada às quatorze horas, do dia nove de março de dois mil e dezoito, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelas professoras abaixo assinadas. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profa. Dra. Cristiane Canan (Orientadora – PPGTA)

---

Profa. Dra. Deisy Alessandra Drunkler (Membro Interno – PPGTA)

---

Profa. Dra. Gislaine Silveira Simões (Membro Externo – UTFPR)

\* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

Dedico esse trabalho à memória de minha mãe, a quem devo toda minha formação pessoal.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Denize (*in memorian*), por todo o amor, dedicação e apoio que me ofereceu por todos esses anos. Infelizmente, a vida não nos permitiu concluirmos mais essa conquista lado a lado, mas tenho certeza do quanto estaria orgulhosa em presenciar esse momento. Você foi a minha força enquanto estive aqui e foi nela que encontrei o caminho para continuar na sua ausência.

À minha família, em especial minha irmã Luciana e meu pai Lenoir, por todo o apoio em minhas decisões, incentivo para minha progressão pessoal, compreensão, amor e paciência.

Ao meu namorado Pablo, pelo companheirismo, amor e estímulo para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos de longa data e aos que fiz nesse período, todos foram muito importantes para que esse trabalho fosse concluído. Agradeço todo o apoio nos momentos bons e ruins, presença não é sobre estar presente.

Ao nosso grupo de pesquisa, em especial a Daneysa, Rosana e Rafael, por todo auxílio, motivação, companheirismo e por todo o trabalho que desenvolvemos em conjunto.

Aos professores, por todo conhecimento compartilhado e pela troca de experiências.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior pela bolsa de estudos.

Aos membros da banca pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

À minha coorientadora Profa Dra. Marinês Paula Corso, pela gentileza, confiança e acessibilidade para as orientações.

Em especial, à Profa Dra. Cristiane Canan, por suas orientações, companheirismo e compreensão. Exemplo de pessoa e profissional dedicada, sempre disposta a dar contribuições e incentivo. Suas orientações, sugestões, troca de conhecimentos e experiências tornaram esse trabalho possível.

## RESUMO

BIASUZ, T. **Obtenção de espécies de *Lactobacillus* microencapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em Salame tipo Milano.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

O objetivo deste estudo foi microencapsular por secagem em *spray dryer* (vazão de 0,6 mL/min a 84 °C) espécies de *Lactobacillus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. paracasei* em carragena (CA), combinada com proteína do farelo de arroz (PFA) e albumina sérica bovina (BSA), seguido de aplicação em salame tipo Milano. Inicialmente, utilizou-se de um Planejamento Fatorial Completo utilizando apenas o *L. rhamnosus* para avaliar os efeitos da concentração de PFA/BSA (1: 1) (1,5% a 2,5%, m/v) e *L. rhamnosus* (0,6% a 1,4%, m/v) em Eficiência de Encapsulação (EE). A concentração de carragena (0,5%, m/v) e Tween-80 foi fixado em todas os ensaios. As microcápsulas obtidas foram caracterizadas quanto às propriedades morfológicas, físicas, térmicas e químicas e viabilidade do microrganismo na digestibilidade. As microcápsulas foram validadas na proporção de PFA:BSA (1,5% m/v.) e *L. rhamnosus* (0,6% m/v). Posteriormente, na mesma proporção foram microencapsulados *L. plantarum* e *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Duas formulações de salame (controle e com microcápsulas de *L. rhamnosus*) tiveram avaliadas a composição-centesimal, resistência a digestibilidade, qualidade microbiológica e sensorial. Os resultados obtidos para *L. rhamnosus* no planejamento experimental a EE variou de 37,7% (PFA/BSA: 2,5%, *L. rhamnosus*: 1,4%) a 99,7% (PFA/BSA: 1,5%, *L. rhamnosus*: 0,6%), com efeito significativo positivo na curvatura ( $p \leq 0,05$ ), indicando tendência de um ponto de máxima EE, em contraste, os termos concentração de PFA/BSA, concentração de *L. rhamnosus* e seu termo de interação tiveram efeito negativo significativo. Os valores de EE obtidos nos ensaios de validação (99,92 e 99,94%) apresentaram uma boa reprodutibilidade dos dados. Para *L. plantarum* e *L. paracasei* os valores foram de EE de 99,5 a 99,8% e de 77 a 79,5%, respectivamente. As análises térmicas, FTIR-UART e morfológicas das microcápsulas detectaram efeito protetor ao *L. rhamnosus*. No teste de digestibilidade foi observado queda de 2 log UFC g<sup>-1</sup> em todos os ensaios quando comparados a contagem das microcápsulas não submetidas à processos de digestão. A contagem gástrica observada foi menor que a contagem intestinal, sugerindo que a solubilização de parte das cápsulas ocorreu a nível intestinal, promovendo proteção do microrganismo. As contagens de bactérias ácidos-láticas nos salames foram de 10<sup>9</sup> UFC g<sup>-1</sup> e 10<sup>10</sup> UFC g<sup>-1</sup>, tendo o salame com microcápsulas de *L. rhamnosus* contagem superior, mantidas após o teste de digestibilidade. A aplicação do teste tetraédrico para análise sensorial não detectou diferenças entre as amostras controle e probiótica ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados observados, indicam que em proporções adequadas (PFA/BSA: 1,5%, Microrganismo: 0,6%) a combinação de CA, PFA e BSA é viável para encapsulação de *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. A aplicação de microcápsulas de *L. rhamnosus* em salame tipo Milano contribuiu para contagem satisfatório de probióticos, mesmo após os processos de digestibilidade, indicando o efeito protetor.

**Palavras-chave:** Spray drying. Proteína do farelo de arroz. Albumina sérica bovina.

## ABSTRACT

BIASUZ, T. **Obtainment *Lactobacillus* species microencapsulated in carrageenan with protein combination and application in Salami type Milano.** Dissertation (Masters in Food Technology) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

The objective of this study was to microencapsulate by drying in *spray dryer* (flow rate of 0.6 mL/min at 84 °C) species of *Lactobacillus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. paracasei* in carrageenan and a blend of rice bran protein (RBP) and bovine serum albumin (BSA), followed by application in Milano-type Salami. Initially, a full factorial design using only *L. rhamnosus* to evaluate the effects of RBP/BSA concentration (1:1) (1.5% to 2.5%, m/v) and *L. rhamnosus* (0.6% to 1.4%, m/v) in encapsulation efficiency (EE). The concentration of carrageenan (0.5%, m/v) and Tween-80 was fixed in all runs. The microcapsules obtained were characterized as to their morphological, physical, thermal and chemical properties and viability of microorganism in digestibility. The microcapsules were validated in the proportion of RPB:BSA (1.5% m/v) and *L. rhamnosus* (0.6% m/v). Subsequently, in the same proportion were microencapsulated *L. plantarum* and *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Two formulations of sausage fermented (control and microcapsules of *L. rhamnosus*) had evaluated of composition-centesimal, resistance to digestibility, microbiological, and sensorial quality. The results obtained for *L. rhamnosus* in the experimental planning the EE varied from 37.7% (RBP/BSA: 2.5%, *L. rhamnosus*: 1.6%) to 99.7% (RBP/BSA: 1.5%, *L. rhamnosus*: 0.6%) with significant positive effect curvature ( $p \leq 0.05$ ), indicating that in the studied range the tendency of a point of maximum EE was observed, in contrast, the terms concentration of RBP/BSA, concentration of *L. rhamnosus* and their interaction term had significant negative effect. For *L. plantarum* and *L. paracasei* were microencapsulate with EE values of 99.5 to 99.8% and 77 to 79.5%, respectively. The thermal analyzes and FTIR-UIR morphological of the microcapsules detected a protective effect on the *L. rhamnosus*. In the digestibility test, a decrease of 2 log CFU g<sup>-1</sup> was observed in all the tests when compared to the count of microcapsules not submitted to the digestion process. The gastric count observed in all trials was lower than the intestinal count, suggesting that the solubilization of part of the capsules occurred at the intestinal level, promoting protection of the microorganism. The analyzes of sausage fermented produced indicate that the legislation is adequate for microbiological and centesimal parameters. The counts of lactic acid bacteria were 10<sup>9</sup> CFU g<sup>-1</sup> and 10<sup>10</sup> CFU g<sup>-1</sup>, and the salami with microcapsules of *L. rhamnosus* counted higher, maintained after the digestibility test. The application of the tetrahedral test for sensory analysis did not detect differences between the control and probiotic samples ( $p \leq 0.05$ ). The observed results indicate that in adequate proportions, (RBP/BSA: 1.5%, Microorganism: 0.6%), that the combination of CA, RBP and BSA are feasible for encapsulation of *L. rhamnosus* and *L. plantarum*. The application of microcapsules of *L. rhamnosus* in Sausage fermented type Milano contributed to a satisfactory count of probiotics, even after the digestibility processes, indicating the protective effect of the product.

**Palavras-chave:** Spray drying. Rice bran protein. Bovine serum albumin.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Tipos de partículas geradas por microencapsulação.....	20
FIGURA 2 - Curva de crescimento de espécies de <i>Lactobacillus</i> .....	39
FIGURA 3 – Curva de contorno para Eficiência (EE%) de encapsulação em função da razão BSA/PFA e <i>L. rhamnosus</i> .....	43
FIGURA 4 - Superfície de resposta para Eficiência (EE%) de encapsulação em função da razão BSA/PFA e <i>L. rhamnosus</i> .....	44
FIGURA 5 - Imagens obtidas no MEV das microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> encapsulado com resolução de 10 µm. Ordenadas com os números dos ensaios correspondentes.....	47
FIGURA 6 - Curvas DTA do <i>L. rhamnosus</i> livre e microencapsulado em carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina correspondente aos ensaios 1 (MC 1) e 4 (MC 4), e microcápsulas sem microrganismo (MC branco).....	53
FIGURA 7 - Curvas TG (a) e suas derivadas correspondentes DTG (b) para <i>L. rhamnosus</i> puro e microencapsulado em carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina nas condições do ensaio 1 (MC 1) e ensaio 4 (MC 4) e microcápsulas sem microrganismo (MC branco).....	54
FIGURA 8 - Espectros FTIR-UATR das amostras de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> livre e microencapsulado correspondente aos ensaios 1 (MC 1) e 4 (MC 4), e das microcápsulas sem microrganismo (MC branco).....	56

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Matriz do planejamento fatorial completo do tipo 2 <sup>2</sup> .....	29
TABELA 2 - Formulações de salame controle e salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> .....	33
TABELA 3 - Parâmetros de crescimento ( $\lambda$ , $\mu$ e $A$ ) preditos pelo modelo de Gompertz modificado e logístico.....	37
TABELA 4 - Índices estatísticos para avaliação do ajuste dos modelo de Gompertz modificado e logístico.....	38
TABELA 5 - Matriz do planejamento fatorial completo do tipo 2 <sup>2</sup> com as variáveis do processo (codificadas e reais) com as respostas de Eficiência de encapsulação (EE%).....	40
TABELA 6 - Efeito dos fatores estudados no planejamento fatorial completo do tipo 2 <sup>2</sup> sobre a Eficiência de encapsulação (EE%) de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	42
TABELA 7 - Análise de Variância (ANOVA) para a resposta Eficiência de encapsulação.....	43
TABELA 8 - Validação do Ensaio 1 para a resposta eficiência de encapsulação (EE%).....	45
TABELA 9 - Validação do Ensaio 1 para a resposta eficiência de encapsulação (EE%) para <i>L. plantarum</i> BG112 e <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> .....	45
TABELA 10 - Diâmetro das microcápsulas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	49
TABELA 11 - Característica das microcápsulas quanto à umidade.....	49
TABELA 12 - Característica das microcápsulas quanto à higroscopicidade.....	50
TABELA 13 - Característica das microcápsulas quanto à atividade de água.....	51
TABELA 14 - Característica das microcápsulas em proporções do ensaio 1 para <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> e validação do ensaio 1 com <i>L. rhamnosus</i> .....	51
TABELA 15 - Efeito da digestibilidade na viabilidade de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> encapsulado.....	58
TABELA 16 - Efeito da digestibilidade na viabilidade em proporções do ensaio 1 para <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> e validação do ensaio 1 com <i>L. rhamnosus</i> .....	59

TABELA 17 - Contagem de Bactérias ácidos-láticas em amostra de salame controle e salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> .....	60
TABELA 18 - Efeito da digestibilidade na viabilidade de bactérias ácido-láticas em salame controle e salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> .....	61
TABELA 19 - Composição centesimal e atividade de água de salame controle e salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> .....	62
TABELA 20 - Análises microbiológicas de salame controle e salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> .....	63
TABELA 21 - Determinação sensorial pelo teste tetraédrico.....	64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1 MICROBIOTA INTESTINAL.....	17
3.2 PROBIÓTICOS.....	18
3.3 MICROENCAPSULAÇÃO.....	19
3.4 MATERIAIS ENCAPSULANTES .....	21
3.5 MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	22
3.6 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS EM ALIMENTOS.....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
4.1. OBTENÇÃO DA CULTURA DE ESPÉCIES DE <i>Lactobacillus</i> LIOFILIZADA...26	
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ENCAPSULAÇÃO DE <i>Lactobacillus</i> ...28	
4.2.1 Eficiência da encapsulação.....	29
4.2.2 Caracterização das microcápsulas.....	30
4.2.3 Teste de digestibilidade.....	31
4.2.4 Teste de validação.....	31
4.3 ENSAIO DE ENCAPSULAÇÃO <i>L. plantarum</i> e <i>L. paracasei</i> .....	32
4.4 ELABORAÇÃO DE SALAME TIPO MILANO COM PROBIÓTICOS.....	32
4.4.1 Análises Físico-químicas.....	33
4.4.2 Análises microbiológicas.....	34
4.4.3 Teste de digestibilidade de salames.....	34
4.4.4 Análise sensorial.....	35
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
5.1 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DE <i>Lactobacillus</i> .....	37
5.2 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS.....	40
5.2.1 Eficiência da encapsulação de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	40
5.2.2 Caracterização das microcápsulas.....	46
5.2.3 Digestibilidade.....	57
5.3 APLICAÇÃO DE <i>Lactobacillus rhamnosus</i> MICROENCAPSULADO EM SALAME TIPO MILANO.....	60

5.3.1 Contagem de Bactérias Ácido-láticas e teste de digestibilidade de Salame Tipo Milano.....	60
5.3.2 Propriedades físico-químicas e análises microbiológicas.....	62
5.3.3 Análise Sensorial.....	63
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como microrganismos que quando ingeridos em quantidades adequadas são benéficos à saúde do hospedeiro (FAO, 2001). O aumento de doenças crônicas não-transmissíveis vem ocasionando a sensibilização da população para melhoria da qualidade de vida, levando a maior procura por alimentos com designação e alegação “saudável” e “funcional”. Nesse sentido, os alimentos probióticos vem ganhando mercado (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os benefícios que os probióticos trazem à saúde como o auxílio no equilíbrio e composição da microbiota intestinal é amplamente difundido. Outros estudos evidenciam possíveis efeitos do consumo de microrganismos probióticos na prevenção e diminuição de sintomas em doenças inflamatórias intestinais, efeitos anticarcinogênicos, atividades antimicrobianas, modulação do sistema imunológico, diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo e atividades antioxidantes (DUBEY et al., 2016; AMBALAM et al., 2016; GOLLWITZER; MARSLAND, 2014; MOAL; SERVIN, 2014; RAMAN et al., 2013; XAVIER; PODOLSKI, 2007; FAO, 2001).

Diversas espécies e gêneros de bactérias são consideradas probióticas, porém os grupos mais utilizados para adição em alimentos são os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium* por seu histórico antigo de uso e por serem consideradas GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro). As características de um probiótico são compostas por resistência a modificação de pH, enzimas digestivas e sais biliares no trato digestório, e capacidade de proliferação ao atingir o intestino (TRIPATHI; GIRI, 2014; FAO, 2001).

Vários são os desafios encontrados para implantação de probióticos em produtos alimentares, pois diversos fatores, tais como pH, acidez, oxigênio, atividade de água, sal, açúcar e produtos químicos, bacteriocinas, aromatizantes e corantes, e as condições de processamento, podem diminuir a viabilidade do microrganismo (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Na busca pela redução das condições adversas encontradas na produção e manutenção dos probióticos, a técnica de encapsulação mostra-se promissora, condicionando um aumento da viabilidade e sobrevivência dos microrganismos. O agente de parede utilizado na encapsulação deve ser capaz de proteger o material do núcleo dos efeitos adversos e também das condições gástricas, mas promovendo a

liberação do microrganismo ao chegar no intestino (CHOTIKO; SATHIVEL, 2016; COGHETTO et al., 2016; ARSLAN et al., 2015).

Os materiais encapsulantes, normalmente utilizados pela indústria alimentícia, são polímeros sintéticos ou naturais, copolímeros e materiais compostos de proteína e carboidratos. Porém, encontra-se como limitação no uso de alguns agentes encapsulantes a baixa estabilidade frente as modificações de pH, diante da necessidade de liberação dos probióticos em meio intestinal, nem todos os materiais encapsulantes são indicados para os processos encapsulação de probióticos (NESTERENKO et al., 2013; DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009).

Visando a obtenção de cápsulas que possuam gastrorresistência, estudo de novos agentes encapsulantes, bem como suas combinações são importantes para que sejam atingidas as características previamente propostas para a encapsulação. A carragena é um polissacarídeo, utilizado pela indústria como estabilizante, geleificante e espessante. Devido a característica geleificação, a carragena é uma alternativa para composição de matrizes de encapsulamento e pode ser usada de forma isolada ou em combinação para conferir melhores características para a cápsula. As proteínas do farelo de arroz e a albumina sérica bovina possuem boas características emulsificantes, além de alta estabilidade, atuam como coadjuvantes nos processos de encapsulação, melhoram o rendimento e eficiência das cápsulas obtidas (SHI et al. 2013; CHANDI; SOGI, 2007; PRATA; SGARBIERI, 2005).

Considerando o *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* como benéficos a saúde, a obtenção de microcápsulas destes microrganismos, imobilizados com agentes encapsulantes combinando polissacarídeos e proteínas, para avaliar a eficiência em diferentes condições é uma inovação, podendo viabilizar a aplicação de probióticos em diferentes matrizes alimentares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Microencapsular espécies de *Lactobacillus* com carragena em combinação com proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina e aplicar em salame tipo Milano.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obter espécies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracase*) encapsulados em carragena em combinação com proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina.
- Caracterizar a morfologia e propriedades das microcápsulas.
- Avaliar a melhor composição de agentes encapsulantes.
- Avaliar a liberação do microrganismo encapsulado *in vitro*.
- Elaborar Salame tipo Milano controle e acrescido de probiótico microencapsulado.
- Caracterizar microbiologicamente os salames tipo Milano e determinar o número de bactérias lácticas totais.
- Realizar as análises de composição centesimal.
- Avaliar sensorialmente os salames elaborados.
- Avaliar a viabilidade do microrganismo encapsulado adicionado ao salame tipo Milano.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal é amplamente estudada quanto ao papel que exerce na saúde e na doença. Sabe-se que a microbiota modula diversas funções no organismo. O entendimento da estabilidade de comensais intestinal é importante para a resolução de doenças, compreendendo mecanismos e possibilitando a prescrição correta a fim de solucionar a disbiose (CLEMENTE et al., 2006).

Alterações na microbiota podem ser exercidas por diferentes fatores, principalmente, fatores extrínsecos ao organismo. A modificação do ambiente, o estado de doença, a colonização por microrganismos patógenos e o fator dieta, desempenham papel importante na disbiose, como no equilíbrio do microbioma intestinal (CLEMENTE et al., 2006).

Jiménez et al. (2008) encontraram contagens de bactérias no mecônio fetal, obtidos de evacuação espontânea em até duas horas de vida. Os autores sugerem que ao contrário do que era aceito até poucos anos de que o feto era estéril e só entraria em contato com as bactérias no trato vaginal da mãe, é possível que exista colonização de bactérias no intestino fetal como um processo de adaptação após o parto, iniciando a modulação da microbiota.

A composição da microbiota intestinal tem sido amplamente estudada em associação a obesidade. Observou-se que indivíduos obesos apresentaram menor diversidade bacteriana (COX; WEST; CRIPS, 2015; COTTILARD et al., 2013). Liu et al. (2017a) identificaram com estudo de coorte o metagenoma e o perfil de metabólitos séricos de obesos, encontrando em abundância bactérias associadas à obesidade na microbiota intestinal, entre elas *Bacteroides thetaiotaomicron*, fermentadora de glutamato e responsável pela diminuição sérica de glutamato nesses indivíduos. Consistentemente, o teste em ratos revelou que esse microrganismo reduziu a concentração sérica de glutamato e resultou no ganho de peso.

O equilíbrio das bactérias intestinais é estudado como importante na supressão da resposta inflamatória e na promoção da resistência imune (O'HARA; SHANANHAM, 2006). Na doença de *Crohn*, doença inflamatória do intestino, em fases críticas de inflamação pode existir um potente desequilíbrio na microbiota e na taxa de crescimento de algumas espécies microbianas (HE et al., 2017).

Entre diversos fatores observados para o desenvolvimentos de câncer, existem os fatores ambientais. Estudos emergentes relatam que a disbiose intestinal pode ser um fator ambiental relacionado ao desenvolvimento de câncer colorretal. A presença de algumas bactérias tem sido relatada com a associação nesse tipo de câncer, *Fusobacterium nucleatum*, foi encontrada em abundância em amostras tecidual de indivíduos acometidos (YU et al., 2017).

Os padrões dietéticos são vistos como importantes na modulação e equilíbrio da microbiota. Sugerindo que a manipulação com microrganismos benéficos por meio da dieta, é uma estratégia promissora na prevenção de doenças (WU et al., 2011; SAAD, 2006).

### 3.2 PROBIÓTICOS

A atuação mais elucidada dos microrganismos probióticos no organismo é em relação a modulação da microbiota intestinal, por um processo de “exclusão competitiva”, o que impede a adesão de microrganismos patogênicos, favorecendo a microbiota intestinal e promovendo a colonização por probióticos (GUARNER; MALAGELADA, 2003). O processo de modulação da microbiota intestinal pode auxiliar em doenças do trato digestório, como síndrome do intestino irritável, intolerância a lactose e na redução de gastroenterites. Além desses efeitos, estudos trazem possíveis ações anticarcinogênica, atividades antioxidantes, efeitos na diminuição de dislipidemias e redução de alergias (DUBEY et al., 2016; AMBALAM et al., 2016; GOLLWITZER; MARSLAND, 2014; RAMAN et al., 2013; XAVIER; PODOLSKI, 2007; KOPP-HOOLIHAN, 2001; KAUR; CHOPRA; SAINI, 2001).

De acordo com Leroy, Verluyten e De Vuyst (2006) para exercer efeito benéfico a saúde é necessário que o probiótico seja ingerido em quantidade suficiente. No ano de 2008 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu a quantidade mínima de  $10^8$  a  $10^9$  log UFC g<sup>-1</sup>/dia, mas a partir da atualização das alegações de propriedades funcionais e probióticas no ano de 2016 ficou estabelecido a apresentação de laudo de análise que comprovem a quantidade mínima viável de microrganismo para estabelecer a função probiótica ao final do prazo de validade do alimento (BRASIL, 2016; BRASIL, 2008).

Os desafios encontrados para manutenção da viabilidade de microrganismos podem ser relacionados com as condições de obtenção da cultura, etapas de

processamento, condições de implantação de probióticos em produtos alimentares, no armazenamento e estabilidade em condições gástricas e intestinais. (TRIPATHI; GIRI, 2014). Bactérias probióticas com alegações à saúde e alimentos probióticos estão disponíveis para o consumidor (FAO, 2001; FAO/WHO, 2002), porém estudos são importantes para a manutenção da viabilidade destes microrganismos diante de condições adversas (CHOTIKO; SATHIVEL, 2016).

### 3.3 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é definida como um conjunto de técnicas que visam proteger um composto, pela formação de uma barreira física com compostos nomeados materiais de parede, que promovem o isolamento do material do núcleo. Seu principal objetivo é a preservação de um composto ativo para que esse consiga desempenhar sua ação em um determinado momento ou local, sem sofrer alterações do meio externo (PAULO; SANTOS, 2017; DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009).

A classificação das microcápsulas pode ser feita pelo seu tamanho e morfologia. Cápsulas com tamanho inferior a 1 µm são consideradas nanocápsulas, tamanho entre 1 a 800 µm são consideradas microcápsulas e maiores de 1000 µm são macropartículas (PAULO; SANTOS, 2017).

Quanto a morfologia as microcápsulas podem ser consideradas (Figura 1): mononucleadas, possuindo uma única câmara dentro da cápsula, esse tipo de sistema é considerado como “reservatório”. Multinucleada, formação de várias câmaras de retenção do material encapsulado dentro da cápsula, essas câmaras podem possuir diferentes tamanhos e formatos. E micropartículas do tipo matriz, que possui material do núcleo disperso no material de parede, o qual forma uma esfera maciça (DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009).

Figura 1 - Tipos de partículas geradas por microencapsulação.



**Fonte:** DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, (2009).

A microencapsulação, além de promover a proteção de um determinado composto do meio externo, pode ser utilizada para mascarar características sensoriais indesejadas, para obter liberação controlada ou direcionada de um determinado composto, aumento da vida útil e evitar efeitos adversos (PAULO; SANTOS, 2017; JYOTHI et al., 2010). A técnica de microencapsulação vem sendo utilizada para encapsular compostos em diferentes segmentos industriais, encapsulando fármacos, produtos alimentares, pesticidas, pigmentos, corantes, com variados tipos de materiais de parede (SCREMIN et al., 2017; BENVEGNÚ et al., 2011).

A liberação do material encapsulado pode ser realizada de maneira controlada, sustentada ou direcionada para o material, por estímulos específicos como mudança de pH, osmose, força de cisalhamento e difusão (LAM; GAMBARI, 2014; DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009; GOUIN, 2004).

Várias são as técnicas utilizadas para a microencapsulação, divididas em três categorias diferentes: métodos químicos, métodos físico-químicos, métodos físico-mecânicos. Os métodos químicos se baseiam nas técnicas de polimerização e policondensação. Os métodos físico-químicos são coacervação simples ou complexa e por fluido supercrítico. Já os métodos físico-mecânicos são realizados por leito-fluidizado, liofilização, extração de solvente e, em especial, atomização (JYOTHI et al., 2010; DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009).

A secagem por *spray dryer* é um método bastante utilizado pela indústria alimentícia, considerando a flexibilidade e a relação de custos do processo. Essa técnica utilizada para microencapsulação envolve a dispersão dos materiais de parede e do núcleo em um meio líquido, seguido de homogeneização e atomização pela evaporação do solvente na câmara de secagem (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016; MARTIN et al., 2015).

A eficiência da encapsulação está condicionada a escolha da técnica e dos materiais de parede, os quais devem garantir a proteção do material encapsulado e promover a liberação no local e forma desejada (ARSLAN et al., 2015).

### 3.4 MATERIAIS ENCAPSULANTES

A escolha do material de parede tem um papel importante na determinação do tamanho da cápsula, textura, porosidade e, principalmente, na garantia de proteção e liberação do material (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Materiais de parede utilizados em encapsulação e destinados a aplicação de alimentos devem possuir características que não alterem o produto final, além de serem biocompatíveis. Os materiais encapsulantes, normalmente utilizados pela indústria alimentícia, são biopolímeros naturais, materiais compostos de proteína, carboidratos e gomas (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015; NESTERENKO et al., 2013).

Materiais como alginato, pectina, proteínas do soro do leite, goma xantana, goma arábica, carragena, quitosana, amido, proteína da soja, caseinato, são utilizados na encapsulação de diferentes compostos aplicados em alimentos. Normalmente, na busca de condições adequadas de microencapsulação esses ingredientes são utilizados em misturas, possibilitando que a cápsula atinja as características previamente propostas (DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; GOUIN, 2004).

A carragena é um polissacarídeo utilizado como aditivo alimentar em diferentes produtos. Possui propriedades geleificantes, espessante e estabilizante. É utilizada em diferentes processos de encapsulação, principalmente, pela sua característica de geleificação, gerando estabilidade a cápsula. A dissolução da carragena em água ocorre em temperaturas entre 50 e 60°C e tem seu processo de geleificação dependente da temperatura. Em processos de encapsulação de probióticos, a eficiência é aumentada quando utilizada em combinação com outros materiais de parede (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016; MARTIN et al., 2015; SHI et al. 2013; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

A proteína do farelo de arroz (PFA) é extraída do subproduto da indústria de beneficiamento do arroz e tem baixo valor agregado. Por outro lado, possui valor nutricional considerado, composto de proteína vegetal de alto valor biológico, além de

ser hipoalergênica, podendo ser utilizada em diferentes produtos alimentares e até mesmo como substituto de proteínas alergênicas. Possui capacidade de formação de espuma e formação de emulsão, apresentando boa estabilidade em diferentes condições (FABIAN; JU, 2011; CHANDI; SOGI, 2007).

Semelhante as características da PFA, a albumina sérica bovina (BSA) também é um subproduto industrial de alto valor tecnológico. É um polímero natural, facilmente metabolizável e capaz de encapsular diversos materiais, sendo relatado seu uso na encapsulação, principalmente, de fármacos (DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009; PRATA; SGARBIERI, 2005; KATTI; KRISHNAMURTI, 1999).

A mistura de carboidratos e proteínas nos processos de encapsulação pode auxiliar na melhora da estabilidade e também na geração de características emulsificantes (PIERUCCI et al., 2007).

### 3.5 MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

A microencapsulação de probióticos é uma alternativa para diminuição das condições adversas que podem diminuir o número de células viáveis ou gerar injúria no microrganismo (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015). A microencapsulação melhora as condições de sobrevivências dos probióticos em relação a exposição a condições ácidas, sais biliares, tratamentos térmicos brando e aos componentes de matrizes alimentares (ECKERT et al., 2017; LIAO et al., 2017; VERRUCK et al., 2017; DARJANI et al., 2016).

Estudos relatam a encapsulação de probióticos por diferentes técnicas, sendo as mais relatadas, liofilização utilizando materiais de parede como alginato, *whey protein* isolado (CHEN et al., 2017; ALBADRAN et al., 2015; RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015; HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2010), extrusão com materiais de parede como alginato de cálcio, quitosana (HALIM et al., 2017, 2017; CHAVARRI et al., 2010), e a técnica utilizando a atomização por *spray dryer*, com diversos materiais de parede, como: *whey protein*, polidextrose, maltodextrina, trealose, leite desnatado, leite em pó reconstituído, prebióticos, goma arábica, frutoligosacarídeos, manitol, proteínas do leite (ARSLAN-TONTUL; ERBA, 2017; BERNUCCI et al., 2017; ECKERT et al., 2017; LIAO et al., 2017; SETH; MISHRA; DEKA, 2017; DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016; LIU et al., 2015;

ANEKELLA; ORSAT, 2013; PISPAN; HEWITT; STAPLEY, 2013; GOLOWCZYC et al., 2011; ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005).

A seleção das técnicas de encapsulação e também dos materiais de parede vão definir as propriedades funcionais e morfológicas da cápsulas, determinando a porosidade, o tamanho e textura das microcápsulas (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015).

A microencapsulação, por técnicas como as apresentadas, podem ser reproduzidas a nível industrial, apresentando como vantagem a diminuição da quantidade microrganismos aplicados ao produtos, já que o microrganismo encapsulado sofrerá menos injúria na passagem pelo trato gastrointestinal, podendo reduzir o custo agregado na produção do alimento probiótico (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015; DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016).

### 3.6 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS EM ALIMENTOS

O aumento do interesse por uma alimentação saudável e a busca por alimentos funcionais, levou ao aumento do emprego de probióticos em alimentos. Porém, apesar de existir quantidades mínimas exigidas do microrganismo no alimento para considerá-lo probiótico, poucos produtos de fato apresentam essa viabilidade bacteriana com a passagem pelo trato digestório (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015; DOUGLAS; SANDERS, 2008).

Além disso, a viabilidade de probióticos em produtos alimentícios depende de fatores como composição físico-química do alimento, atividade de água, pH, presença de oxigênio, quantidade de sal e açúcar adicionados, bacteriocinas, aromatizantes e corantes. E os tratamentos empregados no processamento do alimento, principalmente tratamentos térmicos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Condicionando um aumento da viabilidade, a técnica de encapsulação auxilia na produção de alimentos probióticos, aprimorando alimentos probióticos clássicos de mercado e facilitando na elaboração de novos produtos.

O mercado relacionado a alimentos probióticos, baseia-se, quase que exclusivamente, em produtos lácteos, tais como iogurtes, queijos, leites fermentados e sorvetes. Além disso, poucos estudos vinculam a funcionalidade de microcápsulas em aplicação em alimentos (DE PRISCO; MAURIELLO, 2015; DOUGLAS; SANDERS, 2008).

Com o apelo por uma alimentação saudável e funcional, e a busca pelo aumento da qualidade dos alimentos já consumidos, diferentes estudos buscam o desenvolvimento de produtos acrescidos de probióticos microencapsulados, levando como base matrizes alimentares tradicionais.

Baseado no consumo de produtos panificados por grande parcela da população, esses estão sendo estudados como meio de veiculação para compostos bioativos e também, ácidos graxos, na forma encapsulada ou livre. Em menor proporção, estudos relatam a aplicação de probióticos encapsulados em pães, bolos e biscoitos, incorporados em massas ou na superfície dos produtos. O maior desafio encontrado na utilização dos produtos panificados como matriz para probióticos é o emprego de altas temperaturas no processo de produção. Dessa maneira, deve-se levar em consideração a escolha do material de parede e também as técnicas de preparo do produto em questão (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012; ZANJANI et al., 2012; REID et al., 2007).

A microencapsulação é também uma alternativa para aplicação de probióticos em sucos, pois essa matriz alimentar dificulta a veiculação do probiótico livre, devido suas características de pH. Doherty et al. (2012) realizaram testes de encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG em proteínas do soro do leite com seis tipos de polissacarídeos. Em todas as formulações, os autores concluíram que a encapsulação em proteínas do soro do leite em combinação com pectina, geraram melhores condições de proteção do microrganismo no período de armazenamento do suco e na digestibilidade *in vitro*.

Em produtos cárneos é comum utilizar cultura *starter* para realização de processos fermentativos do produto. Atualmente, a possibilidade de obter produtos probióticos a base de carne tem sido discutida (KOLOZYN-KRAJEWSKA; DOLATOWSKI, 2012; DE-VUYST; FALONY; LEROY, 2008; LEROY; FALONY; DE-VUYST, 2008). Estudos com probióticos encapsulados, para manutenção da viabilidade celular, ainda, é pouco frequente na literatura.

Sidira et al. (2014) encapsularam *Lactobacillus casei* ATCC 393 para aplicação em salsichas fermentadas, utilizando-a como cultura *starter*, mas também com o objetivo de obter um produto probiótico. Foram detectados ao fim do processo de maturação concentração adequada para considerar o alimento probiótico.



Muthukumarasamy; Holley (2006) obtiveram manutenção satisfatória de *Lactobacillus reuteri* encapsulado em alginato de sódio, aplicado em salames, quando comparado com o microrganismo livre.

Observando as condições adversas existentes na aplicação de probióticos em alimentos e também na garantia da manutenção da cultura com a passagem pelo trato gastrointestinal, a técnica de encapsulação torna-se promissora no desenvolvimento de novos produtos (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. OBTENÇÃO DA CULTURA DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus* LIOFILIZADA

Alíquotas de 0,5 g das espécies *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. paracasei* subespécie *paracasei* e *L. plantarum* BG112 liofilizadas foram pré-ativadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 6 horas. Na sequência, alíquotas de 5 mL do caldo pré-ativado foram transferidas para erlenmeyers contendo 95 mL de caldo MRS e incubados para a obtenção das curvas de crescimento. Em intervalos predeterminados, de acordo com a velocidade de crescimento do microrganismo, foram realizadas as leituras da densidade ótica em espectrofotômetro (Perkin Elmer, Lambda XLS, Beaconsfield, Reino Unido) no comprimento de 600 nm para a elaboração das curvas de crescimento. Cada microrganismo teve o seu crescimento acompanhado até atingir a fase estacionária. A temperatura de incubação foi de 30 °C para o *L. plantarum* e *L. rhamnosus* e de 37 °C para o *L. paracasei* (DICK; ENDO, 2009; DESMOND et al., 2002).

Em intervalos entre duas leituras da densidade ótica foi realizado o plaqueamento dos microrganismos em crescimento. As diluições seriadas foram realizadas em água destilada e inoculou-se 1 mL da diluição em placas de Petri empregando-se a semeadura em profundidade em ágar MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha), com adição de sobrecamada e incubação das placas invertidas na temperatura de crescimento empregada para cada microrganismo em específico por 48 horas (KALSCHNE et al., 2014).

A cultura na fase estacionária (re-incubação) foi congelada a -18°C, sendo posteriormente liofilizada (Labconco, Kansas, EUA) por 24 horas a -37 °C e pressão de 0,050 mBar.

Os dados da densidade ótica de cada microrganismo foram ajustados aos Modelo de Gompertz modificado (MGM) (Equação 1) e Modelo Logístico (ML) (Equação 2, 3 e 4). Foram determinados os parâmetros do modelo: duração da fase *lag* ( $\lambda$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ) e população máxima atingida ( $A$ ). Para o ajuste matemático foi empregado o programa Statistica 8.0.

Para avaliar o ajuste dos modelos aos dados experimentais do crescimento microbiano, foram empregados índices estatísticos, conforme descrito por Geitenes et

al. (2013) e Kalschne et al. (2014). Utilizou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Equação 5), o erro médio quadrático ( $MSE$ ) (Equação 6), o fator *bias* ( $FB$ ) (Equação 7) e o fator de exatidão ( $FE$ ) (Equação 8).

$$y = \log Do/Do_{zero}; \quad e = 2,7182; \quad \lambda = \text{duração fase} \quad (1)$$

$lag$  (h);

$$y = A \cdot \exp \left[ -\exp \left( \frac{\mu \cdot e}{A} \cdot (\lambda - t) + 1 \right) \right]$$

$A$  = população máxima atingida;  $t$  = tempo (h);

$\mu$  = velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ ).

$$y = \frac{A}{(1 + \exp(D - Pt))}$$

$$y = \log Do/Do_{zero}; \quad A = \text{população máxima atingida}; \quad (2)$$

$D, P$  = parâmetros do modelo;  $t$  = tempo (h).

$$\mu = C \cdot P / 4$$

$$\mu = \text{velocidade específica máxima de crescimento} \quad (3)$$

$C, P$  = parâmetros do modelo.

$$\lambda = D - 2 / P$$

$$\lambda = \text{duração da fase } lag \text{ (h)}; \quad (4)$$

$D, P$  = parâmetros do modelo.

$$R^2 = \frac{SQRL}{SQT_c}$$

$$SQRL = \text{Soma quadrática da regressão linear}; \quad (5)$$

$SQT_c$  = soma quadrática total corrigido.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (Valor_{observado} - Valor_{predito})^2}{n}$$

$$RSS = \text{soma dos quadrados residuais}; \quad (6)$$

$n$  = número de graus de liberdade.

$$fator_{bias} = 10 \left( \frac{\sum \log(Valor_{observado} / Valor_{predito})}{n} \right)$$

$$n = \text{número de graus de liberdade}. \quad (7)$$

$$fator_{exatidão} = 10 \left( \frac{\sum \left| \log(Valor_{observado} / Valor_{predito}) \right|}{n} \right)$$

$$n = \text{número de graus de liberdade} \quad (8)$$

## 4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus rhamnosus*

Para avaliar as melhores condições de encapsulação, um planejamento fatorial completo do tipo  $2^2$  com três pontos centrais foi utilizado, tendo como variáveis independentes a concentração de proteína do farelo de arroz (PFA) e albumina sérica bovina (BSA) ( $x_1$ ), utilizadas na proporção de 1:1 (m/v), e concentração de *L. rhamnosus* ( $x_2$ ) (Tabela 1). A eficiência de encapsulação (EE) foi a variável dependente avaliada. Em todos os ensaios, a concentração de carragena foi mantida fixa em 0,5 % m/v (SCREMIN et al., 2017).

Este planejamento foi realizado apenas com o *Lactobacillus rhamnosus* liofilizado. Na proporção definida pelo planejamento fatorial (Tabela 1) o microrganismo foi disperso em 50 mL de água destilada com 3 gotas de Tween-80 e mantido sob agitação por 30 minutos. A carragena foi suspensa na proporção de 0,5 % m/v (1 g) em 200 mL de água em temperatura de 60 °C e mantida sob agitação por 15 minutos. Posteriormente, as proteínas foram suspensas nas proporções definidas no planejamento fatorial completo (Tabela 1), na suspensão de carragena. A suspensão do *L. rhamnosus* foi transferida para suspensão de carragena e proteínas, mantendo-a sob agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. A secagem da suspensão foi realizada em *spray dryer* (Labmarq - MSD 1,0, São Paulo, Brasil) com bico injetor com orifício de 0,07 mm de diâmetro, sob temperatura na câmara de secagem de 84 °C e vazão de 0,6 mL/min, condições pré-determinadas por Scremin et al. (2017). As microcápsulas obtidas foram coletadas em frascos esterilizados acoplados ao ciclone. As formulações obtidas foram mantidas sob refrigeração 4 °C  $\pm$  1 °C em ambiente hermético.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>2</sup>.

ENSAIO	x <sub>1</sub> – PFA/BSA (1:1) (%)	x <sub>2</sub> – <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (%)
1	-1 (1,5)	-1 (0,6)
2	+1 (2,5)	-1 (0,6)
3	-1 (1,5)	+1 (1,4)
4	+1 (2,5)	+1 (1,4)
5	0 (2,0)	0 (1,0)
6	0 (2,0)	0 (1,0)
7	0 (2,0)	0 (1,0)

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** PFA: proteína do farelo de arroz. BSA: albumina sérica bovina. x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>: valores codificados para as concentrações das variáveis independentes. (%): valores reais da concentração (% m/v) das respectivas concentrações de proteína e microrganismo adicionadas na suspensão.

#### 4.2.1 Eficiência da Encapsulação

Para definir o pH de abertura das cápsulas no cálculo de Eficiência de Encapsulação (EE), foi realizada a determinação da solubilidade das microcápsulas com o proposto por Rodriguez-Restrepo; Giraldo; Rodríguez-Barona (2017), com modificações, empregando solução tampão com diferentes valores de pH: pH 2,0, pH 4,0, pH 7,0 e pH 8,5. Obtendo solubilidade de 10%, 15%, 30% e 44%, respectivamente, com cinco minutos de agitação. O pH 8,5 apresentou o melhor resultado de solubilidade, optou-se por testar tal pH com tempo de agitação de 5 minutos e descanso de 30 minutos, resultando em um aumento da solubilidade para 85%.

A eficiência da encapsulação (EE) de *L. rhamnosus* foi baseada no número de células viáveis totais e não encapsuladas após a secagem por *spray dryer*. Para realizar a contagem de células não encapsuladas (localizadas na porção externa das microcápsulas ou aderidas à superfície) foi realizada a diluição seriada de 1 g das microcápsulas em 9 mL de água destilada. Para contagem das células viáveis totais (encapsuladas e não encapsulada) foi realizada a abertura das cápsulas pelo emprego de 9 mL da solução de tampão NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L (pH ≅ 8,5) para diluição seriada de 1 g das microcápsulas, mantendo sob agitação por 5 minutos em *vortex* (Islogen, Ism 56/4, Brasil) e repouso de 30 minutos para diluição total da cápsula. O

plaqueamento seguiu o descrito anteriormente no item 3.1. A eficiência foi calculada pela Equação 9 (PICOT; LACROIX, 2003).

$$E = (N_2 - N_1) * 100 / N_2 \quad (9)$$

**Onde:**  $N_1$  = número de células viáveis nas microcápsulas;  $N_2$  = número de células viáveis nas microcápsulas suspensas em tampão  $\text{NaHCO}_3$ , ambos expressos em log UFC  $\text{g}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Caracterização das Microcápsulas

A morfologia e tamanho médio das microcápsulas foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Philips/FEI, modelo Quanta 200). Para análise morfológica as amostras foram recobertas com ouro em metalizador (*Sputtering* BAL-TEC, modelo SCD 050 sputter coater). O cálculo do diâmetro médio das microcápsulas foi realizado com a mensuração de aproximadamente 120 cápsulas de cada amostra (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

A umidade foi determinada pela metodologia da AOAC (2005) utilizando estufa de secagem (Quimis, modelo q313m, São Paulo, Brasil) a  $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  até peso constante. A atividade de água foi determinada em analisador de atividade de água por ponto de orvalho (Aqualab®, 4TE, São Paulo, Brasil). A higroscopicidade foi determinada pesando 0,5 g de pó em cadinhos de porcelana, acondicionados em dessecador com solução salina saturada (75% UR), criando um ambiente de anaerobiose com formação de vácuo, as amostras foram retiradas após uma semana e pesadas. A higroscopicidade foi expressa por gramas de água absorvida por 100 g de base seca (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

O comportamento térmico das amostras de *Lactobacillus rhamnosus* puro e microencapsulado correspondentes aos ensaios 01 (MC 1; EE = 99,7%) e 04 (MC 4; EE = 37,7%) foram avaliados por análise de calorimetria diferencial de varredura (DTA) e termogravimétrica (TG) (*Simultaneous Thermal Analyser*, PerkinElmer, Beaconsfield, Reino Unido). O equipamento foi previamente calibrado com padrão de referência de índio. Para obtenção das curvas de DTA e TG,  $8,0 \pm 0,2$  mg de amostra foram acondicionadas em cadinhos de alumínio, aquecidos de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $700 \text{ }^\circ\text{C}$ , com taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  e mantidos sob fluxo constante de  $\text{N}_2$  ( $20 \text{ mL min}^{-1}$ ). Adicionalmente, uma amostra de microcápsulas sem microrganismo contendo

apenas os materiais de parede (MC branco) foi analisada a fim de comparar às curvas DTA e TG do microrganismo puro e microencapsulado. Para facilitar a visualização dos principais eventos térmicos decorrentes do aumento da temperatura, curvas derivadas TG foram construídas.

As amostras de *L. rhamnosus* livre e microencapsulado (MC 1 e MC 4) e das microcápsulas sem microrganismo (MC branco) foram submetidas a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-UATR). As análises foram conduzidas em equipamento FS 100 (*Frontier Spectrum 100*, Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) empregando-se o modo de refletância total atenuada (UATR), intervalo de número de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , num total de 8 cumulações.

#### 4.2.3 Teste de Digestibilidade

A fim de avaliar a resistência das microcápsulas aos processos digestivos foi realizado o teste de digestibilidade, seguindo o proposto por Eckert et al. (2017). As amostras obtidas em todos os ensaios de encapsulação e os microrganismos livres foram submetidos às condições gástricas e intestinais. Alíquotas de 0,1 g foram submetidas a 1 mL de suco gástrico e incubadas a 37 °C por 3 horas em agitação de 150 rpm. Após 3 horas, no material obtido foi adicionado 1 mL de fluido intestinal, sendo re-incubado a 37 °C por mais 4 horas em agitação de 150 rpm. Alíquotas para contagens de células viáveis foram retiradas após a 3 horas de exposição às condições gástricas e após 4 horas de exposição em condições intestinais, passando por diluição seriada e plaqueamento com semeadura em profundidade conforme o proposto por Kalschne et al. (2014), de modo que as placas foram incubadas por 48 horas.

#### 4.2.4 Teste de Validação

Para o ensaio de validação, *Lactobacillus rhamnosus* (0,6% m/v) foi encapsulado em carragena (0,5 % m/v) e PFA:BSA (1:1) (1,5% m/v) seguindo os procedimentos de suspensão e secagem por *spray dryer* conforme previamente descritos no item 4.2. As amostras obtidas foram armazenadas em ambiente hermético e mantidas sob refrigeração ( $4 \pm 1$  °C).

A validação foi realizada em duplicata e as amostras foram submetidas a determinação da eficiência de encapsulação, análise das propriedades físicas das microcápsulas e digestibilidade. Os resultados obtidos para validação do ensaio 1 estão descritos ao fim de cada item dos resultados e discussão (Item 5).

#### 4.3 ENSAIO DE ENCAPSULAÇÃO do *L. plantarum* e *L. paracasei*

Os ensaios para *L. plantarum* e *L. paracasei* seguiram as proporções definidas no ensaio de validação conforme o descrito no item 4.8, levando em consideração a substituição do microrganismo.

As microcápsulas obtidas dos ensaios de *L. plantarum* e *paracasei* foram submetidas à avaliação da eficiência de encapsulação, análise de propriedades físicas e digestibilidade, a fim de comprovar a confiabilidade de utilização do mesmo material de parede para diferentes microrganismos. Assim, os dados obtidos para as análises estão descritos ao fim de cada item dos resultados e discussão (Item 5).

#### 4.4 ELABORAÇÃO DE SALAME TIPO MILANO COM *L. rhamnosus* encapsulado

A produção do salame tipo milano seguiu os padrões propostos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame tipo Milano - Instrução Normativa (IN) nº 22, de 31/07/2000 (BRASIL, 2000). Foram elaboradas duas formulações de Salame do tipo Milano, Salame controle (sem adição de microcápsulas), Salame com adição de microcápsulas de *L. rhamnosus* ATCC 53103 encapsulados nas proporções de PFA/BSA: 1,5%, Microrganismo: 0,6%, seguindo o proposto por Krummenauer et al. (2015), com adaptação (Tabela 2):



Tabela 2 - Formulações de salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*

Ingredientes	Salame controle (%)	Salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> (%)
Carne suína (retalho magro)	76,49	76,49
Toucinho suíno lombar	18,00	18,00
Cura Ibrac	0,25	0,25
Ibracor 501	0,30	0,30
Cultura <i>Starter Bactoferm SM</i>	0,04	0,04
<i>L. rhamnosus</i> encapsulado	-	0,15
Sal refinado	2,70	2,70
Açúcar cristal	0,80	0,80
Pimenta branca em pó	0,02	0,02
Alho em pó	0,20	0,20
Vinho tinto seco	1,20	1,20
Total	100,00	100,00

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

A carne suína e o toucinho suíno lombar foram moídos em *cutter* (MADO, GARANT MTK 661, Alemanha). A mistura dos ingredientes secos e do vinho tinto foi realizada de forma manual, sendo adicionados a carne, adicionando o toucinho suíno lombar. A cultura *starter bactoferm* foi hidratada por 30 minutos em água e adicionada a mistura. No salame probiótico foi adicionado a mistura microcápsulas de *L. rhamnosus*. Os salames foram embutidos com auxílio de embutideira automática (PCP-10L, Poli, Brusque, Brasil) em envoltórios de celulose com diâmetro de 60 mm (Naturin R2L-D, Viscofan, São Paulo, Brasil), hidratados em água por 30 min. O processo de maturação e secagem foi realizado em câmara (Réfrica, Girona, Espanha) por 40 dias.

#### 4.4.1 Análises Físico-químicas

Os teores de proteínas, lipídios, carboidratos, umidade e cinzas foram quantificados pelas metodologias propostas pela Instrução Normativa nº 20 de 21/07/1999 (BRASIL, 1999). A Atividade de água a 25 °C em determinador de atividade de água (Aqualab®, 4TE, São Paulo).

#### 4.4.2 Análises Microbiológicas

Para contagem de bactérias lácticas no salame controle, 25 g de amostra foram dispostas em plásticos estéreis contendo 225 mL ADPT (0,1%), seguidos de homogeneização. Foram feitas as diluições seriadas e 1 mL de cada diluição foi plaqueada em profundidade com sobrecamada de MRS ágar. Para o salame probiótico a contagem de células não encapsuladas (localizadas na porção externa das microcápsulas ou aderidas à superfície) foi realizada a diluição seriada de 25 g de salame probiótico em 225 mL de água destilada. Para contagem das células viáveis totais (encapsuladas e não encapsulada) foi realizada a abertura das cápsulas pelo emprego de 225 mL da solução de tampão  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L ( $\text{pH} \cong 8,5$ ) para diluição seriada de 25 g de salame probiótico, mantendo sob agitação por 5 minutos em *vortex* (Is logen, Ism 56/4, Brasil) e repouso de 30 minutos para diluição total da cápsula. A contagem de *L. rhamnosus* encapsulado seguiu o proposto na equação 10.

$$R = (N_2 - N_1) \quad (10)$$

**Onde:**  $N_1$  = Contagem do salame probiótico disperso em água destilada;  $N_2$  = Contagem do salame probiótico disperso em tampão  $\text{NaHCO}_3$ , ambos expressos em  $\log \text{UFC g}^{-1}$ .

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada pelo proposto na ISO 6888-1/A1 de 2004, Coliformes a 45 °C pela Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003 (BRASIL, 2003), pesquisa de *Salmonella* seguindo a ISO 6579 de 2017 e contagem de *Clostridium perfringens* pela ISO 7937 de 2005.

#### 4.4.3 Teste de Digestibilidade de Salames tipo Milano

A fim de avaliar a resistência das microcápsulas empregadas na elaboração do salame probiótico, aos processos digestivos foi realizado o teste de digestibilidade, seguindo o proposto por Eckert et al. (2017). As amostras de salame controle e salame probiótico com *L. rhamnosus* encapsulados foram submetidos à condições gástricas e intestinais. Alíquotas de 1 g foram submetidas a 10 mL de suco gástrico e incubadas a 37 °C por 3 horas em agitação de 150 rpm. Após 3 horas, no material obtido foi adicionado 10 mL de fluido intestinal, sendo re-incubado a 37 °C por mais 4 horas em agitação de 150 rpm. Alíquotas para contagens de células viáveis foram retiradas após

a 3 horas de exposição as condições gástricas e após 4 horas de exposição em condições intestinais, passando por diluição seriada e plaqueamento com sementeira em profundidade conforme o proposto por Kalschne et al. (2014), de modo que as placas foram incubadas por 48 horas.

#### 4.4.4 Análise Sensorial

As análises sensoriais foram realizadas no laboratório de análise sensorial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Medianeira após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 74222117.4.0000.0092. O público participante foram funcionários da cooperativa e membros da comunidade acadêmica da UTFPR (docentes, discentes, técnicos administrativos). O participante foi previamente informado que provará formulações de salame acrescidos de probiótico.

Foi entregue um questionário solicitando informações sobre faixa etária, sexo, escolaridade e hábitos de consumo de embutidos, para caracterização do perfil de provadores participantes da análise sensorial e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os salames foram previamente fatiados em espessura fina com o auxílio de fatiadora elétrica. As amostras foram dispostas em copos plásticos transparentes codificados com três dígitos escolhidos aleatoriamente, servidas de acordo com o teste, acompanhado de água potável.

O teste tetraédrico foi realizado com uma equipe piloto composta por 40 provadores, utilizando duas amostras (salame com probiótico microencapsulado e salame sem adição de probióticos), empregando a metodologia proposta por Ennis e Jesionka (2011). Quatro amostras foram apresentadas, duas amostras de cada tipo, e o julgador foi instruído a agrupar as amostras em dois conjuntos com amostras similares, observando a diferença sensorial geral entre eles. Visando mascarar diferenças visuais, a análise foi realizada sob luz vermelha.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise de efeitos, regressão, variância e superfície de respostas do planejamento fatorial completo ( $p \leq 0,05$ ) foi utilizado o *software Statistica 8.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Os dados de umidade, atividade de água e higroscopicidade expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) e avaliados pela ANOVA e Teste de Tukey para comparações de médias ( $p \leq 0,05$ ). As análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) foram avaliadas por ANOVA e Teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o *software Statistica 8.0*.

A análise do teste tetraédrico foi realizada pelo proposto por Roessler et al. (1978), no qual o número de respostas corretas deve ser maior que o número mínimo de respostas corretas tabeladas para que exista diferença entre as amostras.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DE *Lactobacillus*

Os microrganismos tiveram tempos de crescimento diferentes entre si. A pré-ativação do *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foi de 6 horas e do *L. paracasei* de 12 horas.

A determinação da densidade ótica e o plaqueamento foram realizados até que os microrganismos atingissem a fase exponencial de crescimento, do *L. plantarum* foi de 12 horas, do *L. rhamnosus* de 13 horas, do *L. paracasei* de 34 horas.

Na Tabela 3 estão descritos os parâmetros de crescimento preditos pelo modelo de Gompertz modificado (MGM) e modelo logístico (ML). O modelo de Gompertz modificado (MGM) predisse uma fase *lag* menor em relação ao modelo logístico (ML) para os todos microrganismos estudados. A velocidade específica máxima de crescimento foi similar comparando-se ambos modelos para cada microrganismo. A população máxima predita pelo MGM foi maior em relação à predita pelo ML para os três microrganismos.

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento ( $\lambda$ ,  $\mu$  e  $A$ ) preditos pelo modelo de Gompertz modificado e logístico.

Microrganismo	$\lambda$ (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$A$ (log Do/Do <sub>zero</sub> )	$\lambda$ (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$A$ (log Do/Do <sub>zero</sub> )
	Modelo de Gompertz modificado			Modelo logístico		
<i>L. paracasei</i>	2,46	0,11	1,08	2,75	0,10	1,07
<i>L. plantarum</i>	0,42	0,32	1,74	0,56	0,32	1,69
<i>L. rhamnosus</i>	1,74	0,16	1,39	2,22	0,17	1,28

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** Duração da fase *lag* ( $\lambda$ ). Velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ ). População máxima atingida ( $A$ ).

Dentre os microrganismos cultivados verificou-se que o *L. plantarum* teve a menor fase *lag* seguido do *L. rhamnosus* e *L. paracasei*. A velocidade específica máxima de crescimento do *L. plantarum* foi duas vezes maior a do *L. rhamnosus*, e a do *L. paracasei* foi a menor de todos. A menor fase *lag* e maior velocidade específica máxima de crescimento do *L. plantarum* justificam uma curva de crescimento mais curta (12 horas), devido ao crescimento rápido desse microrganismo. Por outro lado, a maior fase *lag* e menor velocidade específica máxima de crescimento do *L. paracasei* justificam uma curva de crescimento maior (34 horas). O *L. plantarum* teve a população máxima atingida e a maior contagem na fase estacionária, atingindo em torno de 12,5 log UFC g<sup>-1</sup>. O *L. rhamnosus* teve a segunda maior população máxima

atingida e contagem na fase estacionária, atingindo 11,5 log UFC g<sup>-1</sup>. A menor população máxima atingida e contagem na fase estacionária, em torno de 8,2 log UFC g<sup>-1</sup> foi verificada para o *L. paracasei* (Tabela 3 e Figura 2).

O ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais está mostrado na Tabela 4. O  $R^2$  foi igual ou maior que 0,978, para todos os casos, sendo considerado um ajuste satisfatório. O *MSE* foi próximo de zero para todos os casos, entretanto o MGM gerou *MSE* mais próximos de zero comparado ao ML. Valores de *FB* maiores que 1 indicam que o valor predito foi maior que o observado e valores menores que 1 indicam que o valor predito foi menor que o observado. Logo, verifica-se que o *L. plantarum* teve um excelente ajuste dos dados experimentais tanto ao MGM quanto ao ML. Para o *L. rhamnosus* notou-se que os valores preditos foram menores que os observados para ambos modelos, que ainda tiveram um bom ajuste. O *L. paracasei* teve *FB* bem inferiores a 1, indicando que os valores preditos foram bem menores que os observados para ambos modelos, não tendo um bom ajuste como para os outros dois microrganismos. Se *FB* apresenta valores maiores que 1, quanto maior o seu valor, menor a exatidão da estimativa da média. Para o *L. plantarum* obteve-se *FE* próximos de 1,00 para ambos modelos, remetendo a um bom ajuste dos modelos matemáticos. Para o *L. rhamnosus* e, principalmente para o *L. paracasei*, o *FE* foi maior, representando uma falta de exatidão para o MGM e ML. Entretanto, os valores do *FE*, considerando o MGM, para esses microrganismos ainda seriam aceitáveis de acordo com os valores previstos por Kalschne et al. (2014).

Tabela 4 - Índices estatísticos para avaliação do ajuste dos modelo de Gompertz modificado e logístico.

	$R^2$	<i>MSE</i>	<i>FB</i>	<i>FE</i>	$R^2$	<i>MSE</i>	<i>FB</i>	<i>FE</i>
	Modelo de Gompertz modificado				Modelo logístico			
<i>L. paracasei</i>	0,985	0,008	0,748	1,504	0,978	0,012	0,690	1,678
<i>L. plantarum</i>	0,998	0,001	1,004	1,028	0,995	0,005	0,997	1,044
<i>L. rhamnosus</i>	0,991	0,005	0,977	1,170	0,989	0,006	0,974	1,194

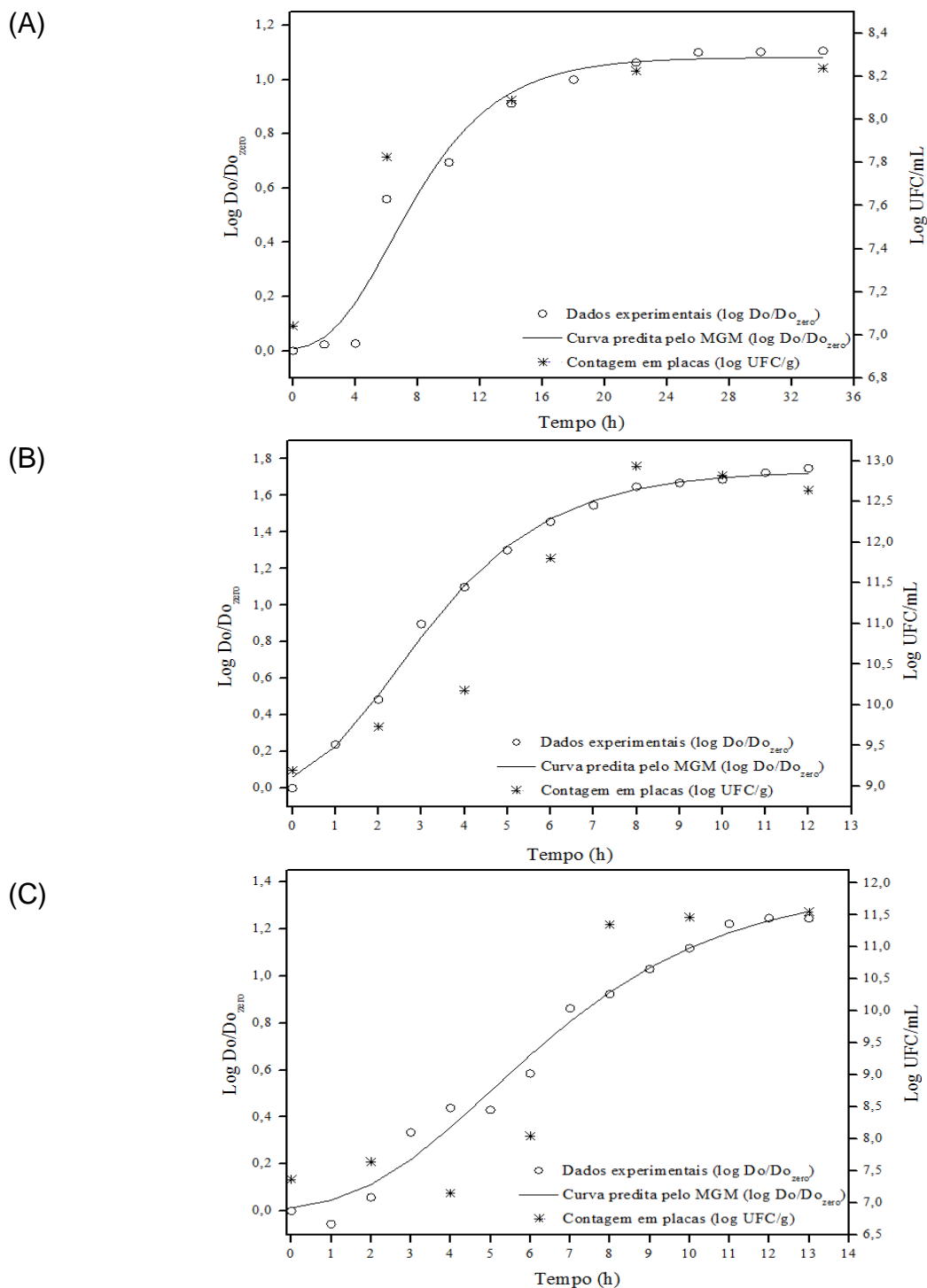
**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:**  $R^2$ : Coeficiente de determinação. *MSE*: Erro médio quadrático. *FB*: fator *bias*. *FE*: Fator de exatidão.

Considerando os índices estatísticos, o MGM foi o que apresentou melhor ajuste para prever os parâmetros de crescimento do *L. paracasei*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus*. De forma similar, Slongo et al. (2009) também compararam a predição dos parâmetros de crescimento de bactérias lácticas em presunto fatiado pelo MGM e ML, e concluíram que o MGM foi o mais adequado.

As curvas de crescimento previstas pelo MGM, os dados experimentais da densidade ótica e as contagens em placas observadas para cada microrganismo são apresentadas na Figura 2.

Figura 2 - Curva de crescimento de espécies de *Lactobacillus*. (A) curva de crescimento do *L. paracasei*; (B) curva de crescimento do *L. plantarum*; (C) curva de crescimento do *L. rhamnosus*



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

### 5.2.1 Eficiência da Encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus*

Para obtenção de espécies de *Lactobacillus* encapsulados utilizou-se de carragena, proteína do farelo de arroz (PFA) e albumina sérica bovina (BSA), devido aos resultados anteriores encontrados pelo grupo de pesquisa do Departamento de alimentos (UTFPR), a citar Scremin et al. (2017) e Veiga (2016) para síntese de microcápsulas de eugenol.

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas e respostas de eficiência de encapsulação (EE%), está apresentada na Tabela 5. O menor valor observado entre as respostas do planejamento foi de 37,7% de eficiência, no ensaio 4, e o maior valor foi de 99,7%, no ensaio 1, o que representa um aumento de 62% na EE na passagem do nível superior para nível inferior da razão PFA/BSA e do *L. rhamnosus*.

Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>2</sup> com as variáveis do processo (codificadas e reais) com as respostas de Eficiência de Encapsulação (EE%).

Ensaio	x <sub>1</sub> – PFA/BSA (1:1) (%)	x <sub>2</sub> – <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (%)	EE (%)
1	-1 (1.5)	-1 (0.6)	99,7%
2	+1(2.5)	-1 (0.6)	96,2%
3	-1 (1.5)	+1 (1.4)	99,3%
4	+1 (2.5)	+1 (1.4)	37,7%
5	0 (2.0)	0 (1.0)	98,2%
6	0 (2.0)	0 (1.0)	98,5%
7	0 (2.0)	0 (1.0)	98,1%

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>: valores codificados para as proporções de mistura das variáveis. (%): valores reais da concentração (p.v %) das respectivas proporções adicionadas na mistura da suspensão.

Considerando que a EE é calculada pela diferença da quantidade total de células viáveis presente nas microcápsulas (microrganismo encapsulado e não encapsulado) da quantidade de microrganismo livre (não encapsulado, depositado na porção externa ou aderido na superfície das microcápsulas), observou que os resultados evidenciam um eficiente processo de encapsulação em quase todos os



ensaios, exceto ensaio 4, apresentando, também, boa reprodutibilidade da variável resposta dos pontos centrais, 98,2%, 98,5% e 98,1%, respectivamente.

Dentre as variáveis independentes do processo Anekella; Orsat (2013) observaram que a temperatura (100 a 130 °C), foi a que mais afetou a sobrevivência dos microrganismos. Os autores encapsularam *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* em maltodextrina, com secagem por *spray dryer* juntamente com polpa de framboesa.

Neste estudo, a temperatura de entrada no atomizador foi mantida fixa em 84 °C. Estudos sugerem que a alta temperatura de saída é mais letal ao microrganismo, portanto, a manutenção da temperatura de alimentação no atomizador, mantém uma temperatura baixa na saída, aumentando a taxa de sobrevivência do microrganismo (CORCORRAN et al., 2004; BOZA; BARBIN; SCAMPARINI, 2004; GARDINER et al., 2000)

Para gerar uma alta taxa de sobrevivência de probióticos em processo de secagem por *spray dryer*, o microrganismo deve, inicialmente, suportar a temperatura empregada no processo de encapsulação, porém, cada cepa possui um tipo de comportamento térmico, devendo observar este comportamento para as cepas estudadas, bem como avaliar o processo de encapsulação em temperatura menores (BOZA; BARBIN; SCAMPARINI, 2004; GARDINER et al., 2000).

Corcorran et al. (2004) testaram três espécies de *Lactobacillus* em encapsulação com leite reconstituído (*L. salivarius*, *L. rhamnosus* E800 e *L. rhamnosus* GG) quanto a resistência térmica em processos de secagem em *spray dryer*, observando a menor resistência térmica na encapsulação de *L. rhamnosus* GG (- 61 °C), porém, em temperatura adequada (55 °C), apresentou a maior taxa de sobrevivência, quando comparado aos outros probióticos testados. Os autores também avaliaram a taxa de sobrevivência em diferentes condições de crescimento (fase lag, exponencial e início da fase estacionária) concluindo que a encapsulação dos probióticos na fase estacionária gerou melhores condições de sobrevivência e diminuição nos danos celulares após a encapsulação.

Analisando-se os resultados da Tabela 5 foi possível calcular os efeitos das variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito dos fatores estudados no planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>2</sup> sobre a Eficiência de encapsulação (EE%) de *Lactobacillus rhamnosus*.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t (2)	p-valor
Média	83,22	0,104083	799,600	<0,00001*
Curvatura	30,08	0,317980	94,608	<0,0001*
x <sub>1</sub> - PFA/BSA	-32,55	0,208167	-156,365	<0,00001*
x <sub>2</sub> – <i>L. rhamnosus</i>	-29,45	0,208167	-141,473	<0,0001*
x <sub>1</sub> by x <sub>2</sub>	-29,05	0,208167	-139,552	<0,0001*

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** \* p≤0,05.

Observou-se que a curvatura teve um efeito positivo ( $p = 0,0001$ ) indicando que pelo menos uma das variáveis estudadas tem efeitos quadráticos na resposta EE, havendo um ponto máximo das variáveis para obtenção da EE. Por outro lado, o efeito da concentração de PFA/BSA ( $p = 0,00001$ ), concentração de *Lactobacillus rhamnosus* ( $p = 0,0001$ ) e seu efeito de interação ( $p = 0,0001$ ) foram negativos. Assim, variando do nível superior ao nível inferior do planejamento (PFA/BSA, 2,5% a 1,5% e microrganismo, 1,4% a 0,6%) a EE foi aumentada.

Considerando-se os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) obteve-se a Equação 10, que representa o modelo da EE em função das variáveis estudadas para a encapsulação.

$$EE = 83,22 - 16,9 x_1 - 14,7 x_2 - 14,5 x_1 x_2 \quad (11)$$

Os dados da análise de variância (ANOVA) para EE estão apresentados na Tabela 7. O  $F_{\text{calculado}}$  (18223,645) para a regressão foi significativo ( $p=0,00548$ ), sendo maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  (19,247), e o percentual de variação explicada pelo modelo foi considerado adequado ( $R^2 \approx 99\%$ ). Considerando o exposto, foi possível concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo válido para representar a eficiência de encapsulação.

Tabela 7 - Análise de Variância (ANOVA) para a resposta Eficiência de encapsulação.

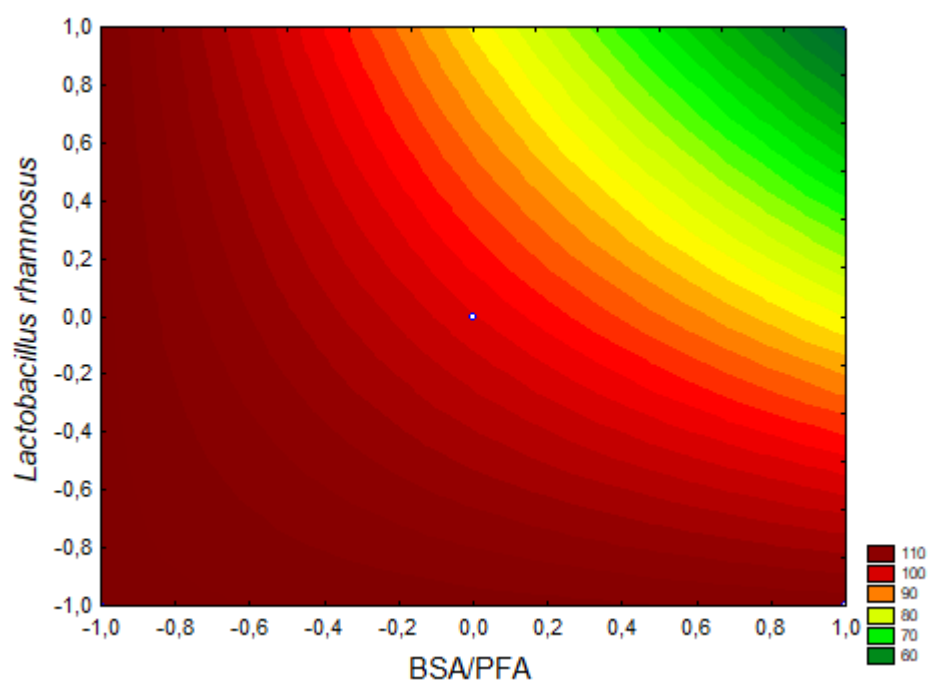
Causa de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	p-valor
Regressão	3158,568	4	789,6419	18223,645	19,247	0,00548
Resíduo	0,087	2	0,043333			
Total	3158,654	6				

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota:  $R^2=0,99997$ ;  $R_{ajustado}=0,99992$

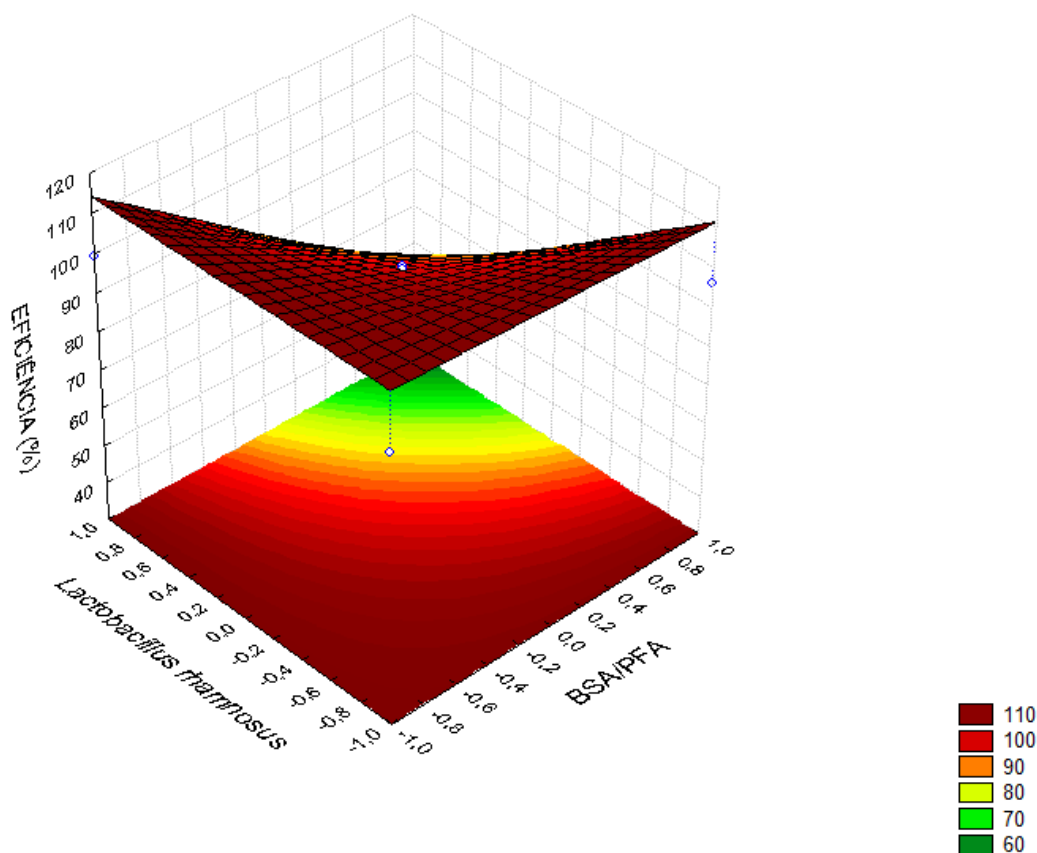
Desta forma, foi possível construir a curva de contorno (Figura 3) e superfícies de resposta (Figura 4) para o comportamento da EE.

Figura 3 - Curva de contorno para Eficiência (EE%) de encapsulação em função da razão BSA/PFA e *L. rhamnosus*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 - Superfície de resposta para Eficiência (EE%) de encapsulação em função da razão BSA/PFA e *L. rhamnosus*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar em análise da curva de contorno (Figura 3) e da superfície de resposta (Figura 4), que no nível inferior das variáveis  $x_1$  e  $x_2$  do planejamento experimental obtêm-se EE próximo a 100% (ensaio 1: 99,7%), já com a passagem do nível inferior para o superior observa-se a diminuição na EE.

A explicação para a diminuição da eficiência da encapsulação com a passagem para o nível superior é sugerida pela razão entre a carragena, mantida fixa nesse planejamento. A carragena é uma galactana sulfatada, que devido a presença de grupo sulfato na sua estrutura química, a torna um forte polímero aniônico que pode atrair proteínas carregadas positivamente (SCREMIN et al., 2017; CORDEIRO, 2014; FABIAN; HUYNH; JU, 2010). Fabian; Huynh; Ju (2010), observaram um aumento da precipitação de PFA quando aumentada a razão de 1:1 (carragena/PFA) para 2:1 (carragena/PFA). Dessa forma, o ensaio 4 (37,7%), teve uma razão de 1:5 (carragena/PFA e BSA), tendo um 1 g de carragena para 2,5 g de PFA e 2,5 g de BSA, sugerindo uma menor interação entre carragena e proteínas. E, também, com o microrganismo (nível superior), tendo menor adesão ao material transportador devido

a proporção, gerando uma menor estabilidade na cápsula e menor proteção do *L. rhamnosus* (CRITTENDEN et al., 2001)

Uma EE próxima a 100% sugere um maior efeito protetor para os microrganismos encapsulados. Em virtude da porcentagem próxima de 100% encontrada no ensaio 1, optou-se pela validação deste ensaio, por meio da reprodução da formulação em duplicata e reprodutibilidade das análises realizadas. Para os ensaios de validação foram obtidos valores de EE de 99,92 e 99,94% (Tabela 8).

Tabela 8 – Validação do Ensaio 1 para a resposta eficiência de encapsulação (EE%).

Ensaio	x <sub>1</sub> – PFA/BSA (1:1) (%)	x <sub>2</sub> – <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (%)	EE (%)
V1*	-1 (1.5)	-1 (0.6)	99,92%
V2**	-1 (1.5)	-1 (0.6)	99,94%

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** \*Teste de validação 1. \*\*Teste de validação 2. Os testes de validação correspondem as proporções do ensaio 1 do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

A fim de confirmar se as proporções utilizadas para encapsulação de *L. rhamnosus* geraria a mesma resposta de eficiência obtida no ensaio 1, foram realizados ensaios com *L. plantarum* BG112 e *L. paracasei subsp. paracasei*., apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Validação do Ensaio 1 para a resposta eficiência de encapsulação (EE%) para *L. plantarum* BG112 e *L. paracasei subsp. paracasei*.

Ensaio	x <sub>1</sub> – PFA/BSA (1:1) (%)	x <sub>2</sub> – Microrganismo (%)	EE (%)
<i>L. plantarum</i> 1*	-1 (1.5)	-1 (0.6)	99,8%
<i>L. plantarum</i> 2*	-1 (1.5)	-1 (0.6)	99,5%
<i>L. paracasei</i> 1**	-1 (1.5)	-1 (0.6)	77%
<i>L. paracasei</i> 2**	-1 (1.5)	-1 (0.6)	79,5%

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** Os resultados de eficiência expressos na tabela referem-se: \* *L. plantarum* BG112. \*\* *L. paracasei subsp. paracasei*, utilizando as proporções das variáveis independentes previamente previstas para o ensaio 1 do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

Foi possível observar que a EE do *L. plantarum* BG112 foi semelhante a obtida com encapsulação do *L. rhamnosus* 53103, podendo ser usado com mesma confiabilidade para esse probiótico. Diferentemente, os resultados obtidos com *L. paracasei subsp. paracasei* tiveram uma diminuição em média de 20% na EE, quando comparados as duas outras espécies. A explicação para a diminuição da EE para esse

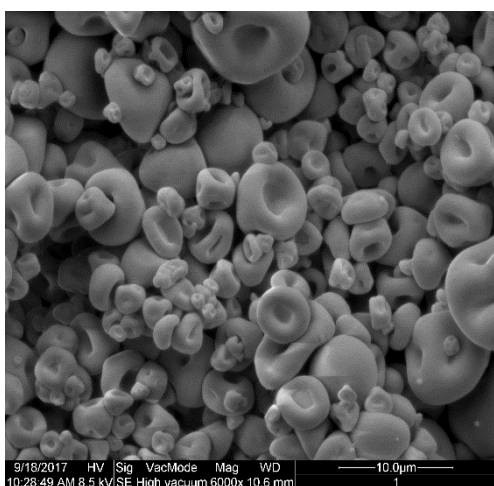
microrganismo deve ser explorada nas características já citadas, em relação aos fatores intrínsecos de cada cepa, observando a necessidade de planejamento específico para tal.

### 5.2.2 Caracterização das Microcápsulas

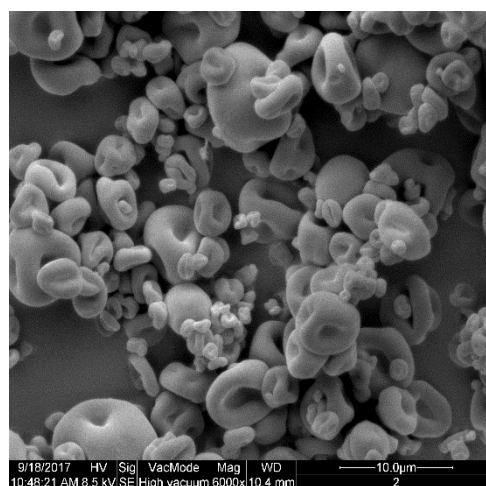
A Figura 5 expõe as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as microcápsulas de *L. rhamnosus* obtidas pelo planejamento fatorial completo, em secagem por *spray dryer*. Com as micrografias foi possível observar que os ensaios E1, E2, E5, E6 e E7 apresentaram formato mais ovalado, com concavidade no centro da cápsula, possuindo superfícies lisas, sem rachaduras. Já os ensaios E3 e E4 apresentaram formato arredondado sem presença de concavidade. O E3 apresentou uma característica de rugosidade na parede da microcápsula quando comparados com os outros ensaios, porém, o E4 além da rugosidade, é possível observar fissuras e rachaduras na superfície da microcápsula, confirmando a baixa eficiência de encapsulação encontrada nesse ensaio.

Figura 5 –Imagens obtidas no MEV das microcápsulas de *L. rhamnosus* encapsulado com resolução de 10  $\mu\text{m}$ . Ordenadas com os números dos ensaios correspondentes.

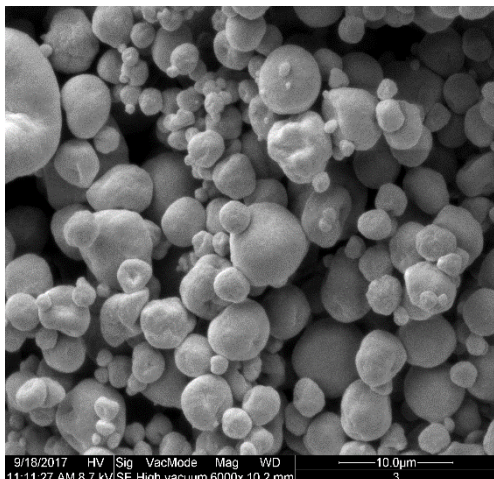
E1



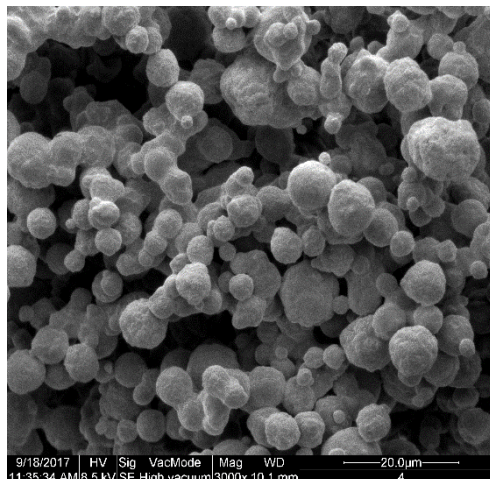
E2



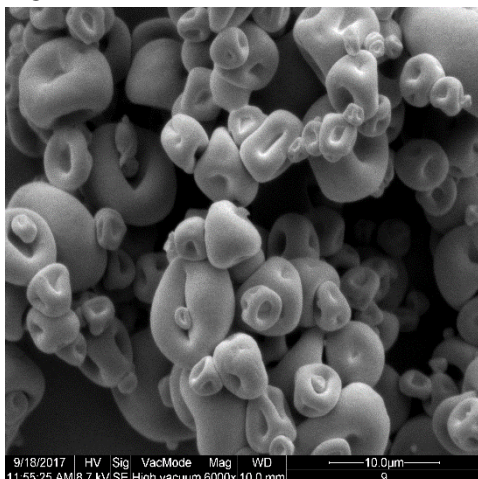
E3



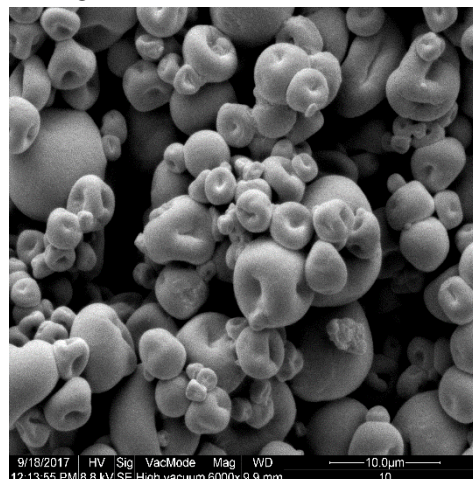
E4



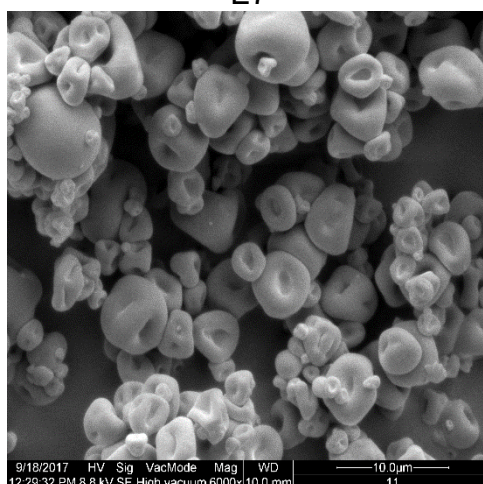
E5



E6



E7



Fonte: Elaborada pelo autor.

Khem; Small; May (2016) sugerem que conformação ovalada e concavidades observadas em microcápsulas obtidas pela secagem por *spray dryer*, podem estar

relacionadas a diminuição rápida da umidade nos processos de secagem. Ilha et al. (2014) confirmaram tal explicação, relatando que concavidades e até mesmo achatamentos são típicos de microcápsulas resultantes da secagem por *spray dryer*, e podem aumentar a resistência mecânica e a difusão em solutos.

Fritzen-Freire et al. (2012) obtiveram morfologia semelhante às obtidas no presente estudo encapsulando *Bifidobacterium* BB12 em leite reconstituído. Ilha et al. (2014) e Desmond et al. (2002) observaram a formação de concavidades em cápsulas de *L. paracasei*.

Além do formato, o tamanho da microcápsula é um fator importante na proteção do material encapsulado, na resistência e estabilidade e também na entrega do material. Ying et al. (2010) consideraram as etapas do processo como principal influência no tamanho da partícula. A viscosidade e quantidade de sólidos na solução de alimentação do atomizador, a característica do bico injetor, a vazão e a composição da matriz encapsulante, são citadas pelos autores.

O diâmetro médio das microcápsulas variaram entre 0,98 a 4,42  $\mu\text{m}$  no menor diâmetro e 6,78 a 10,67  $\mu\text{m}$  no maior diâmetro, com diâmetros médios entre 2,70 a 5,84  $\mu\text{m}$  (Tabela 10). Diâmetros similares foi encontrado por Veiga (2016) na encapsulação de eugenol, 3,4 a 4,6  $\mu\text{m}$ , utilizando os mesmos materiais de parede e condições experimentais no processo de encapsulação deste estudo.

Diâmetro médio de 10,96  $\mu\text{m}$  foi obtido por Ilha et al. (2014) na encapsulação de *L. paracasei* em soro obtido de queijos. Tonon et al. (2009) testaram três materiais diferentes em encapsulação (goma arábica, maltodextrina e farinha de tapioca) de açaí, foi possível constatar tamanhos diferentes entre os ensaios, obtendo menores diâmetros em microcápsulas com goma arábica (9,13  $\mu\text{m}$ ), seguida de maltodextrina (10,94  $\mu\text{m}$ ) e tapioca (13,97  $\mu\text{m}$ ). Os autores explicam que o tamanho da partícula utilizada no material de parede pode influenciar o tamanho da microcápsula obtida.



Tabela 10 - Diâmetro das microcápsulas de *Lactobacillus rhamnosus*

Ensaio	x <sub>1</sub> -PFA/BSA (%)	x <sub>2</sub> - <i>L. rhamnosus</i> (%)	Diâmetro menor (µm)	Diâmetro maior (µm)	Diâmetro médio ± DP (µm)
1	-1 (1.5)	-1 (0.6)	0,98	8,29	3,18±1,75
2	+1(2.5)	-1 (0.6)	1,25	9,02	2,70±1,41
3	-1 (1.5)	+1 (1.4)	1,07	6,78	3,19±1,58
4	+1 (2.5)	+1 (1.4)	4,42	8,80	5,84±1,62
5	0 (2.0)	0 (1.0)	1,96	10,67	4,13±2,53
6	0 (2.0)	0 (1.0)	2,39	9,96	4,48±2,06
7	0 (2.0)	0 (1.0)	1,70	9,41	4,13±1,76

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além das características morfológicas é importante observar as propriedades físicas de microcápsulas, consideradas como determinantes da qualidade e estabilidade da microencapsulação.

A faixa de umidade recomendada para microcápsulas de probióticos, para melhora nas condições de sobrevivência do microrganismo durante o armazenamento, é abaixo de 10%. Verificando na Tabela 11 as características de umidade dos pós obtidos nos ensaios, somente o ensaio 3 e 4 não estão de acordo com o sugerido pela literatura (KONOVALOV; GATAPOVA; KUDRA, 2010; RIVEROS; FERRER; BÓRQUEZ, 2009).

De acordo com o Wang; Yu; Chou (2004) e Santivarangkna; Kulozik; Foerst (2007) os parâmetros relacionados ao conteúdo de água são importantes na estabilidade da cultura probiótica. Além disso, o teor de umidade depende do material de parede, do microrganismo e das características de armazenamento.

Para Konovalov; Gatapova; Kudra (2010) a cinética de transferência de massa e conteúdo de água em processo de secagem por *spray dryer* dependem do fator tempo-temperatura.

Tabela 11 - Característica das microcápsulas quanto à umidade

Ensaio	x <sub>1</sub> -PFA/BSA (%)	x <sub>2</sub> - <i>L. rhamnosus</i> (%)	Umidade ± DP (g 100g <sup>-1</sup> )
1	-1 (1.5)	-1 (0.6)	7,81±0,21 <sup>cdefg</sup>
2	+1(2.5)	-1 (0.6)	5,93±0,65 <sup>cd</sup>
3	-1 (1.5)	+1 (1.4)	12,40±1,5 <sup>abefg</sup>
4	+1 (2.5)	+1 (1.4)	11,15±0,64 <sup>abefg</sup>
5	0 (2.0)	0 (1.0)	4,28±0,43 <sup>acd</sup>
6	0 (2.0)	0 (1.0)	3,76±0,36 <sup>acd</sup>
7	0 (2.0)	0 (1.0)	3,89±0,09 <sup>acd</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Os resultados correspondem à média das amostras ± desvio padrão. a, b, c, d, e, f, g - as médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Wang; Yu; Chou (2004) obtiveram valores de umidade entre 4,2 a 10,6% em microcápsulas de probióticos encapsulados em extrato aquoso de soja fermentado. A temperatura de saída do ar no *spray dryer* variou entre 60, 75 e 90 °C, concluindo que o aumento na umidade ocorre com a diminuição da temperatura. Desmond et al. (2002) encontraram percentual de umidade entre 2,76 a 2,53 para microcápsulas de *Lactobacillus paracasei* em goma acácia. Diferentemente, Ilha et al. (2014) obteve teores de umidade entre 4,30 a 4,77%, os autores sugerem que os resultados podem ser explicados pela temperatura de saída de ar entre 55 e 60 °C, semelhantes as observadas neste estudo.

Em relação à higroscopicidade, foram observados nesse estudo valores entre 18,51 g 100g<sup>-1</sup> a 27,74 g 100g<sup>-1</sup>. Sabendo que tal fenômeno está relacionado a adsorção de água pelas partículas presentes no meio, Tonon et al. (2009) relacionou as possíveis diferenças ao número de grupos hidrofílicos presentes na estrutura dos materiais.

Na Tabela 12 é possível observar a característica de cada ensaio em relação a higroscopicidade. Em comparação, pode-se perceber que em condições em que o microrganismo estava no nível superior ou central as cápsulas foram mais higroscópicas. Tonon et al. (2009) cita que a adsorção de água por um carboidrato está relacionada ao oxigênio presente na molécula de água e os grupos hidroxílicos disponíveis na região amorfa do substrato.

Tabela 12 - Característica das microcápsulas quanto à higroscopicidade

Ensaio	x <sub>1</sub> -PFA/BSA (%)	x <sub>2</sub> - <i>L. rhamnosus</i> (%)	Higroscopicidade ± DP (g 100g <sup>-1</sup> )
1	-1 (1.5)	-1 (0.6)	22,18±0,03 <sup>bcf</sup>
2	+1(2.5)	-1 (0.6)	18,51±0,20 <sup>acdefg</sup>
3	-1 (1.5)	+1 (1.4)	27,74±0,02 <sup>abdeg</sup>
4	+1 (2.5)	+1 (1.4)	23,73±1,10 <sup>bc</sup>
5	0 (2.0)	0 (1.0)	24,25±1,53 <sup>bc</sup>
6	0 (2.0)	0 (1.0)	25,21±0,55 <sup>ab</sup>
7	0 (2.0)	0 (1.0)	23,65±0,97 <sup>bc</sup>

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** Os resultados correspondem à média das amostras ± desvio padrão. a, b, c, d, e, f, g - as médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Em relação a atividade de água (Tabela 13) os valores obtidos variaram de 0,29 a 0,33. Desmond et al. (2002) também encontraram valores de atividade de água próximos a 0,3. Semelhante também ao encontrado por diversos autores que realizaram encapsulação com secagem por *spray dryer* (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016; ILHA et al., 2014; FRITZEN-FREIRE et al., 2012). Tonon et al. (2009)

relataram que atividade de água abaixo de 0,3 é benéfica para estabilidade do pó microencapsulado, pois resulta em uma menor quantidade de água livre para as reações bioquímicas, resultando no aumento na vida útil.

Tabela 13 - Característica das microcápsulas quanto à atividade de água

Ensaio	x <sub>1</sub> -PFA/BSA (%)	x <sub>2</sub> - <i>L. rhamnosus</i> (%)	Atividade de água
1	-1 (1.5)	-1 (0.6)	0,29±0,00 <sup>cefg</sup>
2	+1(2.5)	-1 (0.6)	0,29±0,00 <sup>cefg</sup>
3	-1 (1.5)	+1 (1.4)	0,35±0,02 <sup>abd</sup>
4	+1 (2.5)	+1 (1.4)	0,31±0,00 <sup>c</sup>
5	0 (2.0)	0 (1.0)	0,33±0,00 <sup>ab</sup>
6	0 (2.0)	0 (1.0)	0,33±0,00 <sup>ab</sup>
7	0 (2.0)	0 (1.0)	0,33±0,00 <sup>ab</sup>

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** Os resultados correspondem à média das amostras ± desvio padrão. a, b, c, d, e, f, g - as médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Na Tabela 14 estão descritas as propriedades físicas das microcápsulas validadas, ou seja, elaboradas na proporção do ensaio 1, o qual obteve a melhor eficiência de microencapsulação. Os ensaios de validação apresentaram boa reprodutibilidade em termos de umidade, higroscopicidade e atividade de água. Já os ensaios elaborados com *L. paracasei subsp. paracasei* e *L. plantarum* BG112 tiveram características próprias, como o percentual de umidade obtida no ensaio com *L. plantarum* BG112, com 5,68% de umidade, sendo mais satisfatório nesse quesito que as microcápsulas com *L. rhamnosus*. A amostra elaborada com *L. paracasei subsp. paracasei* apresentou maior higroscopicidade que as demais, tal fato pode estar relacionado a eficiência de encapsulação (77%), dessa forma o contato do microrganismo com o material de parede foi menor, aumentando a retenção de água.

Tabela 14 - Característica das microcápsulas em proporções do ensaio 1 para *L. paracasei*, *L. plantarum* e validação do ensaio 1 com *L. rhamnosus*.

Ensaio	Umidade ± DP (g 100g <sup>-1</sup> )	Higroscopicidade ± DP (g 100g <sup>-1</sup> )	Atividade de água
PV1*	7,45±0,31	21,33±0,29	0,29±0,00
PV2**	7,30±0,2	21,80±0,38	0,29±0,00
PR***	7,08±0,74	24,11±0,68	0,31±0,00
PT****	5,68±0,24	21,89±0,20	0,29±0,00

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

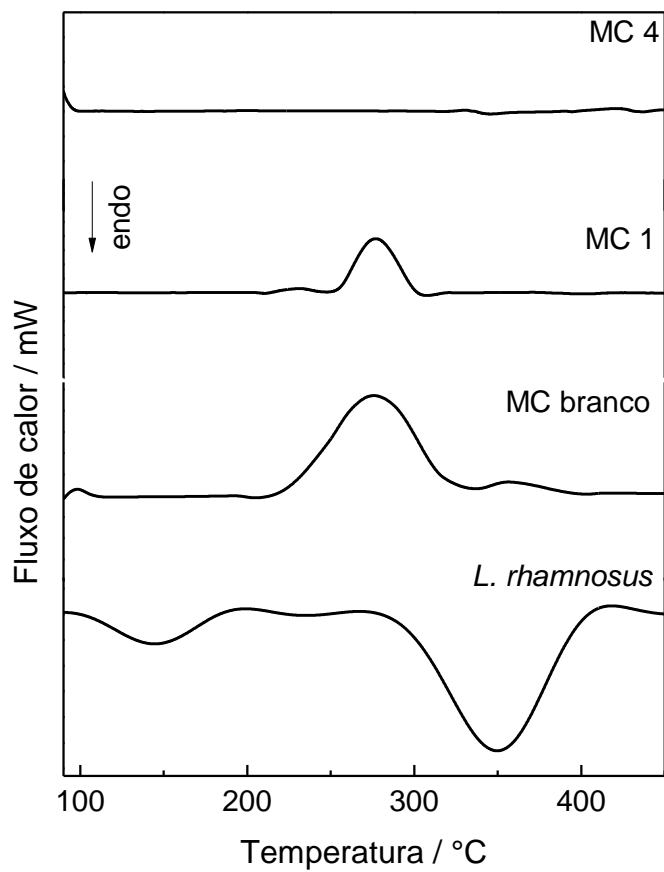
**Nota:** \*Ponto de validação 1; \*\* Ponto de validação 2; \*\*\*Ensaio com *Lactobacillus paracasei*; \*\*\*\*Ensaio com *Lactobacillus plantarum*.

Na Figura 6 são mostradas as curvas DTA para as amostras de *L. rhamnosus* livre e microencapsulado correspondentes as microcápsulas dos ensaios 1 (MC 1; PFA:BSA = 1,5 % m/v; *L. rhamnosus* = 0,6% m/v) e 4 (MC 4; PFA:BSA = 2,5% m/v;

*L. rhamnosus* = 1,4% m/v), bem como, as amostras de microcápsulas sem microrganismo (MC branco; PFA:BSA = 2 % m/v; *L. rhamnosus* = 0 % m/v). Dois eventos térmicos principais foram observados na curva DTA do microrganismo livre; o primeiro, à 145 °C e o segundo, a 350 °C, que caracteriza a degradação da matéria orgânica. Curvas DTA de microcápsulas sem microrganismo (MC branco) e de microcápsulas do ensaio 1 (MC 1) exibiram pico exotérmico à temperatura de 276 °C. Este pico exotérmico é característico da carragena (TANAKA et al. 2001) utilizada como um dos materiais de parede utilizado neste estudo. Em contrapartida, as microcápsulas correspondentes ao ensaio 4 (MC 4) não exibiram o referido pico exotérmico, o que sugere que nesta condição experimental diferentes interações entre os materiais podem ter ocorrido, o que poderia afetar as demais propriedades das microcápsulas produzidas.

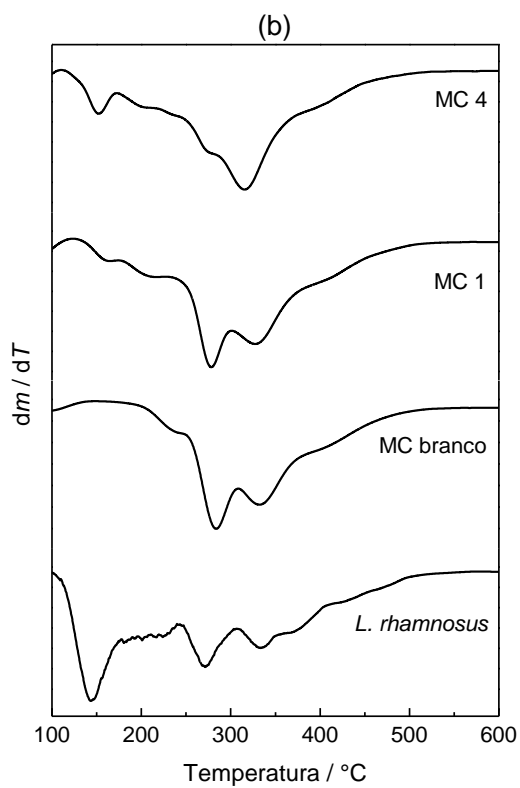
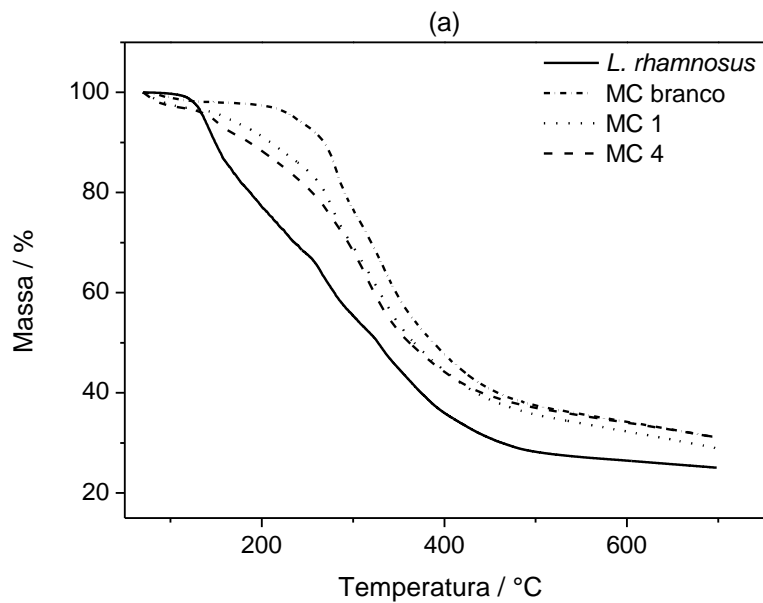
As curvas termogravimétricas (TG) e suas derivadas correspondentes (DTG) são mostradas na Figura 7 (a, b). As curvas TG do microrganismo encapsulado tem uma tendência similar à curva das microcápsulas sem microrganismo, contudo, ambas diferem da curva do microrganismo livre (Figura 7a). Ademais, observa-se maior estabilidade térmica dos materiais nas microcápsulas sem microrganismo (MC branco), sugerindo a presença de microrganismo na porção externa das microcápsulas, o que possibilitou em uma perda de massa mais acentuada nas temperaturas de aquecimento iniciais quando comparados aos materiais de parede puros (MC branco). Os principais eventos de perda de massa das microcápsulas ocorrem a temperatura superior à 270 °C, caracterizada como a degradação do material. À temperatura de 600 °C as microcápsulas apresentaram uma massa residual de aproximadamente 30%.

Figura 6 - Curvas DTA do *L. rhamnosus* livre e microencapsulado em carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina correspondente aos ensaios 1 (MC 1) e 4 (MC 4), e microcápsulas sem microorganismo (MC branco).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Curvas TG (a) e suas derivadas correspondentes DTG (b) para *L. rhamnosus* puro e microencapsulado em carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina nas condições do ensaio 1 (MC 1) e ensaio 4 (MC 4) e microcápsulas sem microrganismo (MC branco).



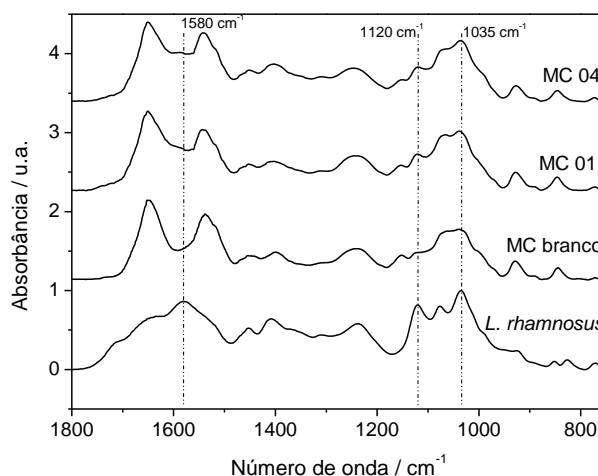
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para compreender o comportamento térmico das amostras, os principais eventos térmicos para o microrganismo livre e encapsulado foram identificados pela curva DTG (Figura 7b), sendo observados eventos à 145, 271 e 334 °C, etapas correspondentes ao processo de perda de umidade da amostra e sua respectiva degradação. Diferente do observado para o microrganismo puro, as amostras de microcápsulas sem microrganismo apresentaram três eventos térmicos principais; um à 238 (menor intensidade), seguido de um à 284 °C e outro à 332 °C, ambos mais intensos. Os mesmos eventos térmicos observados para o microrganismo puro e para os materiais de parede (identificados pela análise da MC branco) podem ser identificados na curva DTG das microcápsulas do ensaio 1 (MC 1), à temperatura de 162, 278 e 328 °C; contudo, em menor intensidade do que no microrganismo puro, sendo os dois últimos picos similares ao processo térmico observado para os materiais de parede (MC branco). Em contrapartida, na curva DTG das amostras de microcápsulas do ensaio 4 (MC 4), um evento térmico mais intenso é observado à 162 °C, seguido de outros menos intensos à 203, 231 e 275 °C, seguido de outro de maior intensidade à 315 °C. Esta diferença de comportamento térmico observada na curva DTG das microcápsulas do ensaio 4 podem indicar a maior presença de microrganismo na porção externa das microcápsulas, corroborando com o reportado para a eficiência de encapsulação.

Os espectros obtidos na análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-UATR) são visualizados na Figura 8. Bandas de absorção à 1650 e 1540  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes aos grupos funcionais amida I e amida II (SOMBOONSUB et al. 2015), respectivamente, foram observadas nos espectros FTIR-UATR das amostras de microcápsulas sem microrganismo (MC branco) e das amostras de microrganismo microencapsulado (MC 1 e MC 4). Estas bandas são características da proteína do farelo de arroz e da albumina sérica bovina utilizadas como material de parede das microcápsulas. Apesar da alta intensidade das bandas correspondentes aos materiais de parede, bandas de absorção características do microrganismo também são observadas nos espectros das microcápsulas. Em 1580  $\text{cm}^{-1}$  uma banda correspondente à deformação  $\text{NH}_2$  de amida II (YANG et al., 2014), presente no espectro FTIR-UATR do microrganismo livre, pode ser observada no espectro das amostras de microrganismo encapsulado e, a mesma, não aparece nas microcápsulas sem microrganismo. Bandas de absorção em 1120 e 1035  $\text{cm}^{-1}$  são

observadas nos espectros FTIR-UATR das amostras de microrganismo puro e encapsulado, não sendo identificadas na amostra de microcápsulas sem microrganismo. Bandas de absorção na região de 1200 à 900  $\text{cm}^{-1}$  são correspondentes as vibrações C-O-C característica de polissacarídeos, o que pode estar relacionada com presença de glicopeptídeos e/ou lipopolissacarídeos da membrana celular do microrganismo encapsulado (OKURO et al., 2013). Assim, estes resultados confirmam a presença do microrganismo nas microcápsulas. Comparando os espectros FTIR-UATR das amostras de microrganismo encapsulado, observa-se que a banda à 1035  $\text{cm}^{-1}$  apresenta maior intensidade no ensaio 4 do que no ensaio 1, o que pode sugerir a presença de maior quantidade de microrganismo voltado para a porção externa da microcápsula.

Figura 8 - Espectros FTIR-UATR das amostras de *Lactobacillus rhamnosus* livre e microencapsulado correspondente aos ensaios 1 (MC 1) e 4 (MC 4), e das microcápsulas sem microrganismo (MC branco).



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Com os dados obtidos na literatura e as características das microcápsulas obtidas nesse estudo, foi possível observar resultados satisfatórios nas propriedades morfológicas e físicas, gerando estabilidade na cápsula, com formação de pós satisfatórios ao armazenamento e potencial para aplicação em produtos alimentares.



### 5.2.3 Digestibilidade

As amostras de células livres e encapsuladas em diferentes proporções de matriz foram submetidas a digestibilidade *in vitro*, investigando a sobrevivência do probiótico na passagem pelo trato gastrointestinal. Na Tabela 15 estão especificados os efeitos das condições gástricas e intestinais na contagem de *L. rhamnosus* encapsulado. Em comparativo, são apresentadas as contagens referentes aos pós obtidos nos ensaios de microencapsulação.

Em todos os ensaios (Tabela 15), observou-se uma diminuição gradual na contagem de *L. rhamnosus* expostos as condições gastrointestinais. Uma queda de 2 log UFC.g<sup>-1</sup> foi observada em todas as formulações de microcápsulas quando comparadas à contagem das amostras não submetidas ao processo de digestão (contagem inicial). Em relação ao microrganismo livre, ocorreu queda de 3 log UFC g<sup>-1</sup> quando comparada à contagem inicial. Estes resultados corroboram com o reportado por Golowczyc et al. (2011) que ressaltam que a encapsulação não somente protege o microrganismo a fim de manter uma contagem satisfatória, mas auxilia na diminuição dos efeitos adversos encontrados no trato gástrico, evitando lesões que diminuem a resistência da célula.

Relacionando todas as contagens e o percentual de recuperação das células no suco intestinal, observou-se que somente o ensaio 1 teve aumento de 2 log UFC g<sup>-1</sup> na contagem à nível intestinal quando confrontada aos dados de contagem gástrica, fato que pode indicar a solubilização de parte das microcápsulas nessas condições, possibilitando a liberação do microrganismo. Porém, com exceção do ensaio 4, em todos os ensaios houve um aumento da contagem na condição intestinal, o que indica resistência ao suco gástrico de um percentual de microrganismos presentes nas microcápsulas, confirmando seu efeito protetor. Além disso, é importante ressaltar a existência de microrganismos na parte externa das microcápsulas, fato que pode colaborar com a contagem gástrica.

Crittenden et al. (2006) conseguiram comprovar a abertura das cápsulas, contendo *Bifidobacterium infantis* em alginato e prebióticos, a nível intestinal com o uso de microscopia. As amostras analisadas relevaram que o microrganismo permaneceu aprisionado no material de parede quando colocadas em condições gástricas, sofrendo dissolução quando transferidas para condições intestinais.

Várias são as estratégias utilizadas para microencapsulação, resultando em diferentes abordagens quanto à eficácia e também de viabilidade frente a condições extremas. Particularmente, esses fatores são relacionados a cepa utilizada no estudo, pois cada microrganismo possui características distintas diante de fatores extrínsecos e intrínsecos. Ainda, na técnica de encapsulação, os materiais utilizados, o emprego ou não em produtos alimentícios, podem interferir na viabilidade do microrganismo e interferir na estabilidade da cápsula em condições gástricas.

Tabela 15 - Efeito da digestibilidade na viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulado

Ensaio	Contagem pó (UFC g <sup>-1</sup> )	Contagem gástrica (UFC g <sup>-1</sup> )	Contagem intestinal (UFC g <sup>-1</sup> )
1	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
2	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
3	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
4	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
5	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
6	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
7	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Células livres	10 <sup>9</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** Contagem pó refere-se ao total das microcápsulas (microrganismo encapsulado e não encapsulado). Células livres: *Lactobacillus rhamnosus* livre.

Liu et al. (2017b) encapsularam *L. rhamnosus* em proteínas do leite e produtos da reação de Maillard. As microcápsulas foram adicionadas em queijo e o produto obtido foi testado em condições gastrointestinais. Os resultados obtidos pelos autores foi de redução imediata na contagem a nível gástrico, mas com redução nos sais biliares, diferentemente do encontrado nesse estudo, sugerindo abertura das cápsulas em meio gástrico.

Ding; Shah (2009) encapsularam diversos microrganismo probióticos, entre eles, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. plantarum* Lpc-37 e *L. paracasei* Lp-115 em ensaios com diferentes materiais de parede (goma guar, goma xantana, carragena, alginato e goma de alfarroba), por meio da técnica de emulsão. Com exposição à condições ácidas foram observadas perdas na viabilidade dos microrganismos nos diferentes materiais de parede, no entanto, os testes utilizando goma xantana, alginato e carragena, conseguiram manter uma viabilidade maior que de outros materiais testados. Apesar da perda da viabilidade do microrganismo encapsulado, essa foi substancialmente menor em relação aos probióticos livres. Em todos os ensaios, a cepa de *L. rhamnosus* utilizada no estudo, se sobressaiu na viabilidade após a digestão gástrica, quando comparada aos outros probióticos.

Em um estudo proposto por Liao et al. (2017) *L. casei* Lk-1 microencapsulado em leite desnatado reconstituído possibilitou um efeito protetor superior ao microrganismo em encapsulado em maltodextrina e trealose considerando as condições gástricas e intestinais. Estes resultados reforçam a importância da utilização de materiais proteicos como agentes encapsulantes

Semelhantemente aos outros estudos, foi observada uma diminuição na viabilidade do probiótico quando exposto às condições gástricas e intestinais. Como relatado anteriormente, sugere-se que há manutenção das cápsulas em condições gástricas e liberação em condições intestinais. Madureira et al. (2011) citam que a natureza anfifílica dos sais biliares podem se tornar um forte agente antimicrobiano, diminuindo a sobrevivência de bactérias, principalmente quando expostas as condições sub-letais no trato gástrico. Portanto, acredita-se que a encapsulação com carragena, PFA e BSA conferiu um efeito protetor sobre o probiótico estudado em todos os ensaios do planejamento, na validação do ensaio 1, e também para os ensaios utilizando *L. plantarum* BG112, quando comparados a diminuição em log UFC g<sup>-1</sup> dos microrganismos livres. Diferentemente, essa proteção não foi efetiva para o *L. paracasei subsp. paracasei* (Tabela 16), ressaltando aqui a diminuição relativa na eficiência de encapsulação desse microrganismo.

Tabela 16 - Efeito da digestibilidade na viabilidade em proporções do ensaio 1 para *L. paracasei*, *L. plantarum* e validação do ensaio 1 com *L. rhamnosus*

Ensaio	Contagem pó (UFC g <sup>-1</sup> )	Contagem gástrica (UFC g <sup>-1</sup> )	Contagem intestinal (UFC g <sup>-1</sup> )
PV1*	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
PV2**	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
PR***	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
PT****	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
Células livres PR	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
Células livres PT	10 <sup>9</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** Contagem pó refere-se a contagem total das microcápsulas (microrganismo encapsulado e não encapsulado). \*Ponto de validação 1; \*\* Ponto de validação 2; \*\*\*Ensaio com *Lactobacillus paracasei*; \*\*\*\*Ensaio com *Lactobacillus plantarum*. Células livres PR: *Lactobacillus paracasei* livre. Células livres PT: *Lactobacillus plantarum* livre.

Minelli; Benini (2008) sugerem que a concentração de 10<sup>6</sup> log UFC mL<sup>-1</sup> no intestino delgado é capaz de desenvolver efeito clínico benéfico sobre a microbiota. Ainda, Cordonnier et al. (2015) explica que modelos de digestão simulada utilizando somente o probiótico ou as microcápsulas, podem subestimar a viabilidade *in vivo*, considerando que o consumo de microcápsulas empregada em alimentos, ou com alimentos, podem aumentar a viabilidade pelo aumento temporário do pH gástrico.

Tais estudos corroboram com preceito de testar as microcápsulas adquiridas em matrizes alimentares.

### 5.3 APLICAÇÃO DE *Lactobacillus rhamnosus* MICROENCAPSULADO EM SALAME TIPO MILANO

#### 5.3.1 Contagem de Bactérias Ácido-láticas e teste de Digestibilidade de Salame Tipo Milano

De acordo com a atualização das alegações de propriedades funcionais e probióticas, para ser considerado um produto probiótico deve ocorrer a manutenção do microrganismo até o fim do prazo de validade (BRASIL, 2016). Anteriormente, definia-se produto probiótico aquele com contagem acima de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ . Nesse estudo, foram observadas contagens satisfatórias de bactérias ácidos-láticas  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  e  $10^{10}$  UFC  $g^{-1}$ , tendo o salame com microcápsulas de *L. rhamnosus* contagem superior (Tabela 17).

Tabela 17 - Contagem de Bactérias ácidos-láticas em amostra de salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*.

Amostra	Bactérias ácido-láticas totais (UFC $g^{-1}$ )
Salame Controle	$10^9$
SMLR* sem abertura das cápsulas	$10^9$
SMLR* com abertura das cápsulas	$10^{10}$
**Valor referente ao probiótico encapsulado	$10^{10}$

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** \*Salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*. As contagens sem abertura das cápsulas referem-se a dispersão em água. As contagens com abertura das cápsulas referem-se a solubilização em tampão  $NaHCO_3$  0,1 mol/L (pH  $\cong$  8,5). \*\* refere-se a Equação 10:  $R = (N_2 - N_1)$  Onde:  $N_1$  = Contagem do salame probiótico disperso em água destilada;  $N_2$  = Contagem do salame probiótico disperso em tampão  $NaHCO_3$ , ambos expressos em log UFC  $g^{-1}$ .

Drosinos et al. (2005) relatam que bactérias ácido-láticas possuem boa adaptação a carne, favorecendo a taxa de crescimento nos processos de maturação e fermentação. Estudos de aplicação de microrganismos encapsulados encontraram contagens entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  com redução de ciclos logaritmos ao fim do prazo de validade (SIDIRA et al., 2014; RUIZ, 2011). Para os autores, a aplicação do microrganismo encapsulado na forma inerte pode garantir maior viabilidade celular, como o aplicado nesse estudo.

Além da contagem satisfatória dos probióticos no produto alimentício, outro fator importante a ser considerado, é a resistência a passagem pelo trato digestório e capacidade de multiplicar e colonizar o trato intestinal. Os testes de digestibilidade realizados com as amostras de salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus* demonstram resistência do microrganismo encapsulado quando comparados a contagem da cultura *starter* aplicada na forma livre ao salame controle com redução de 2 ciclos logaritmos (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeito da digestibilidade na viabilidade de bactérias ácido-láticas em salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*.

Ensaio	Contagem inicial (log UFC g <sup>-1</sup> )	Contagem gástrica (UFC g <sup>-1</sup> )	Contagem intestinal (UFC g <sup>-1</sup> )
Salame controle	10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
SMLR*	10 <sup>10</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup>

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** \*Salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*. Contagem inicial refere-se a contagem de bactérias ácidos-láticas totais nos salames.

A análise da manutenção de *L. rhamnosus* GG aplicado em salames na forma não liofilizada foi avaliada por Rubio et al. (2014) com testes de resistência ao trato gastrointestinal por meio de coleta e contagem do probiótico em fezes de humanos submetidos a dieta específica com o consumo do salame, foram detectados níveis de 6 a 7 log/UFC g<sup>-1</sup> indicando resistência ao longo de todo o trato gastrointestinal. Porém, os autores destacam que a persistência na ingestão é o fator principal, pois a colonização ocorreu de forma transitória, não persistindo após 40 dias do cessar do consumo de salame probiótico.

Comparando aos dados anteriormente apresentados para digestibilidade das microcápsulas na forma livre, a manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus* microencapsulado, foi maior quando adicionado ao salame, indicando um efeito protetor da matriz alimentar na passagem pelo trato digestório, fator confirmado por Klingber; Budde (2006) em estudo de administração, de probióticos liofilizados e probióticos aplicados em salame, em grupos de indivíduos saudáveis, relatando proteção pela matriz alimentar.

Na maioria dos estudos, as microcápsulas de probióticos são adicionadas como cultura *starter*, porém, observando os resultados encontrados na contagem e também na digestibilidade, o uso do probiótico encapsulado a fim de resultar em uma população viável após a passagem pelo trato digestório, combinado de cultura *starter* comercial, torna-se uma alternativa.

### 5.3.2 Propriedades Físico-químicas e Análises Microbiológicas

De acordo com a Instrução Normativa nº 22 de 31/07/2000 – Regulamento Técnico de Salame tipo Milano, apresentadas na Tabela 19, as amostras de salames produzidas estão de acordo com as características exigidas pela legislação brasileira.

Tabela 19 - Composição centesimal e atividade de água de salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*.

Determinações	Legislação*	Salame controle	Salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i>
Umidade (g.100 g <sup>-1</sup> )	Máx. 35	27,7 <sup>a</sup> ± 0,5	26,4 <sup>a</sup> ± 0,7
Proteína (g.100 g <sup>-1</sup> )	Mín. 23	30,8 <sup>a</sup> ± 0,2	31,6 <sup>a</sup> ± 0,3
Lipídios (g.100 g <sup>-1</sup> )	Máx. 35	29,5 <sup>a</sup> ± 0,7	29,8 <sup>a</sup> ± 0,9
Cinzas (g.100 g <sup>-1</sup> )	-	9,24 <sup>a</sup> ± 0,5	9,33 <sup>a</sup> ± 0,6
Atividade de água	Máx. 0,90	0,82 <sup>a</sup> ± 0,00	0,82 <sup>a</sup> ± 0,00
pH	-	5,75 <sup>a</sup> ± 0,00	5,65 <sup>a</sup> ± 0,00

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** \* Instrução Normativa nº 22 de 31/07/2000 – MAPA. Os resultados correspondem à média das amostras ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença entre os tratamentos (p≥0,05, teste t).

Para o estabelecimento e manutenção do padrão de identidade e qualidade do produto é importante que as características do produto tradicional sejam preservadas na inserção de novos ingredientes. Observa-se que a inclusão de microcápsulas de *L. rhamnosus* não interferiu na composição centesimal do produto. Semelhantemente, Vasconcelos (2016) não encontrou diferenças na composição centesimal de Salame tipo Milano com microcápsulas de *L. plantarum* quando comparadas ao salame controle.

O pH e atividade de água são fatores determinantes para a estabilidade de salames ao longo do prazo de validade, inibindo a multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos. A atividade de água dos salames estão de acordo com a legislação e semelhantes aos valores obtidos por Ruiz (2011) em salames tipo italiano com microcápsulas de *L. acidophilus* e *B. lactis* encapsulados em gordura interesterificada de palma e palmiste. Os valores de pH dos salames foram semelhantes, identificando que o microrganismo encapsulado não gerou alterações nas características tradicionais do produto.

As características microbiológicas do salame controle e do salame com microcápsulas de *L. rhamnosus* são apresentadas na Tabela 20. De acordo com a RDC nº 12 de 02/01/01 (BRASIL, 2001) a qual estabelece os valores máximos de

detecção permitidos para cada parâmetro microbiológico, as duas amostras de salames apresentaram resultados satisfatório para contagem de *Staphylococcus coagulase*, *Clostridium*, *Salmonella* ssp. e Coliformes termotolerantes.

Tabela 20 - Análises microbiológicas de salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*

Parâmetros	Legislação*	Salame controle	Salame com microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i>
<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g)	Ausência	Ausência	Ausência
Staphylococcus coagulase positiva (UFC g <sup>-1</sup> )	5x10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>
Coliformes a 45°C (UFC g <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup>	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>
Clostridium sulfito redutor a 46° C (UFC g <sup>-1</sup> )	-	<10 <sup>1</sup>	<10 <sup>1</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota:\* RDC nº 12 de 02/01/01 (BRASIL, 2001).

Portanto, as características físico-químicas, de composição centesimal e qualidade microbiológica tornam o produto próprio para o consumo, sendo possível a realização de análise sensorial das amostras produzidas.

### 5.3.3 Análise Sensorial

O processo de análise sensorial é realizado a partir das respostas fisiológicas transmitidas pelos indivíduos através de estímulos e sensações, resultando na interpretação de características dos produtos. O estímulo é resultante de processos físicos e químicos, já as sensações remetem a processos psicológicos (IAL, 2008).

Neste sentido, análise sensorial é utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações aos atributos de alimentos e outros produtos de consumo, da forma como são sentidas pelo olfato, gosto, tato, visão e audição (CHAVES, 2005).

Para caracterização da equipe de provadores, foi realizado levantamento de dados relacionados a sexo, idade, grau de instrução e padrão de consumo de produtos cárneos e salame. A equipe foi composta por provadores de gênero heterogêneo (feminino (43%), masculino (58%)), com idade predominantemente inferior a 26 anos (78%), de 26 a 35 anos (18%) e acima de 40 anos (5%). A escolaridade da equipe variou entre: Superior incompleto (80%); Superior completo (5%) e Pós-graduação (13%). A maioria dos provadores relataram consumo de produtos cárneos, destacando-se Salame (93%); Linguiça (82%); Calabresa (85%); Hambúrguer (85%). Tratando-se da frequência de consumo de salames a maioria dos participantes relataram consumir ocasionalmente (65%), seguido de três vezes na semana (23%); 8% uma vez na semana; e 5% todos os dias.

A inclusão de probióticos, diferentes dos utilizados em cultura *starter* comercial, poderia modificar as características sensoriais de salames. Rubio et al. (2013) observaram diferenças nos padrões de textura de salames controle, salame com *L. rhamnosus* e salame com *L. plantarum*, relatando maior dureza em amostras acrescidas de probióticos. Menor aceitação no sabor de salame pode ocorrer pelo aumento na inserção de Bactérias ácido-láticas, gerando dominação na microbiota do produto, diminuindo a capacidade das reações de microrganismos nativos da microbiota da carne, capazes de gerar sabores mais intensos (RUBIO et al., 2014; RUBIO et al., 2013).

Visando detectar qualquer diferença entre as amostras apresentadas foi aplicado o teste tetraédrico, com apresentação de quatro amostras, duas de salame controle e duas de salame com microcápsulas de *L. rhamnosus*, orientando a separação desses em dois grupos de amostras similares.

O teste foi realizado com uma equipe piloto de consumidores composta por 40 provadores, previamente orientados sobre os princípios do teste. Os resultados dos julgamentos são apresentados na Tabela 21. Observa-se que 17 provadores realizaram as combinações corretas entre os pares, e 23 não conseguiram identificar quais amostras pertenciam ao mesmo grupo. Considerando o previsto por Roessler et al. (1978), é necessário um mínimo de 19 julgamentos corretos para que haja diferença significativa entre as amostras. Sendo assim, não foram percebidas diferenças entre as amostras de salame controle e salame com microcápsulas de *L. rhamnosus* pelos consumidores, indicando que a inserção das microcápsulas não interferiu no padrão sensorial do produto.

Tabela 21 - Determinação sensorial pelo teste tetraédrico

<b>Número mínimo de acertos*</b> N=40	<b>Acertos</b>	<b>Erros</b>
19	17 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Nota:** \* número de acertos mínimos para 40 julgadores, de acordo com Roessler et al. (1978). Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença entre os tratamentos ( $p \geq 0,05$ ).

Vasconcelos (2016), Muthukumarasamy; Holley (2006), e Ruiz (2011) não encontraram diferenças significativas entre salames controle e salames com microcápsulas de *Lactobacillus*, concordando com o encontrado nesse estudo com a aplicação do teste tetraédrico.



## 6 CONCLUSÃO

Foi possível obter espécies de *Lactobacillus* microencapsulados em matriz de carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica bovina com variações de Eficiência de Encapsulação. As análises morfológicas, térmicas e FTIR-UART das microcápsulas detectaram efeito protetor ao microrganismo maior no ensaio PFA/BSA: 1,5%, *L. rhamnosus*: 0,6% quando comparado ao ensaio PFA/BSA: 2,5%, *L. rhamnosus*: 1,4%. O teste de digestibilidade sugere resistência nas condições gástricas e solubilização intestinal da microcápsula, aumentando a viabilidade dos probióticos encapsulados em comparação aos probióticos livres. Os resultados observados, indicam que em proporções adequadas (PFA/BSA: 1,5%, Microrganismo: 0,6%) a combinação de carragena, proteína do farelo de arroz e albumina sérica é viável para encapsulação de *L. rhamnosus* e *L. plantarum*.

A aplicação de microcápsulas de *L. rhamnosus* (PFA/BSA: 1,5%, Microrganismo: 0,6%) em salame resultou em contagem satisfatória e efeito protetor adicional da matriz do alimento foi identificado no teste de digestibilidade. Com a análise sensorial não foram encontradas diferenças entre amostra controle e probiótica, identificando que a inserção não gera alteração no produto alimentício.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBADRAN, H. A.; CHATZIFRAGKOU, A.; KHUTORYANSKIY V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions, **Food Research International**, v. 74, p. 208-216, 2015.
- ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; MORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSELL, C. M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 166–174, 2012.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, v.15, p.399–409, 2005.
- ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 17-24, 2013.
- AMBALAM, P.; RAMAN, M.; PURAMA, R. K.; DOBLE, M. Probiotics, Prebiotics and Colorectal Cancer Prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119–131, 2016.
- AOAC. American Organization Of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Arlington: AOAC, 2005.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of Probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* Var: *Boulardii* with Different Wall Materials by Spray Drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M.; Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT**, v. 81, p.160-169, 2017.
- BERNUCCI, B. S. P.; LOURES, C. M. G.; LOPES, S. C. A.; OLIVEIRA, M. C.; SABINO, A. P.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; LACERDA, I. C.; NICOLI, J. R.; OLIVIRA, E. S. Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup>. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 341-347, 2017.

BENVEGNÚ, D. M.; BARCELOS, R. C.S. ; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; PASE, C. S. ; OURIQUE, A. F. ; BECK, R. C. R. ; BÜRGER, M. E. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 332-336, 2011.

BOZA, Y.; BARBIN, D.; SCAMPARINI, A. R. P. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1275–1284, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e, ou, de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Atualizado em Julho de 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 05/11/2016

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>> Acesso em: 15/04/2017

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 22 de 31/07/2000**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de *Jerked Beef*, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabres, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburgues, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. Diário Oficial da União, Brasília, 03/08/2000.

CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Functional properties of rice bran protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 592–597, 2007.

CHAVARRI, M.; MARANON, I.; ARES, R.; IBANEZ, F.C.; MARZO, F.; MDEL, C.V. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **Int J Food Microbiol**, v. 142, p. 185-189, 2010.

CHAVES, J.B.P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. 3<sup>o</sup> ed. Viçosa, 2005.

CHEN, H.; LI, X.; LIU, B.; MENG, X. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 248-255, 2017.

CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran-extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 420–427, 2016.

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The impact of gut microbiota on human health: An integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-1270, 2012.

COGHETTO, C. C.; FLORES, S. H.; BRINQUES, G. B.; ZACHIA-AYUB, M.A. Viability and alternative uses of a dried powder, microencapsulated *Lactobacillus plantarum* without the use of cold chain or dairy products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 54–59, 2016.

CORCORRAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 5, p. 1024–1039, 2004.

CORDEIRO, T. M. **Galactanas sulfatadas: estrutura química e atividade biológica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

CORDONNIER, C.; ETIENNE-MESMIN, L.; DENIS, S.; ALRIC, M. Dynamic In Vitro Models of the Human Gastrointestinal Tract as Relevant Tools to Assess the Survival of Probiotic Strains and Their Interactions with Gut Microbiota. **Microorganisms**, v. 3, p. 725–745, 2015.

COTILLARD, A.; KENNEDY, S.P.; KONG, L. C.; PONS, N.; LE CHATELIER, E.; ALMEIDA, M.; QUINQUIS, B.; LEVENEZ, F.; GALLERON, N.; GOUGIS, S.; RIZKALLA, S.; BATTO, J. M.; DORÉ, J.; ZUCKER, J. D.; CLÉMENT K.; EHRLICH, S. D. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, p. 585–588, 2013.

COX, A.J.; WEST, N.P.; CRIPPS, A.W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v. 3, p. 207–215, 2015.

CRITTENDEN, R.; LAITILA, A.; FORSSELL, P.; et al. Adhesion of Bifidobacteria to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3469–3475, 2001.

CRITTENDEN, R.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; et al. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3 p. 2280-2282, 2006.

DARJANI, P.; HOSSEINI NEZHAD, M.; KADKHODAEI, R.; MILANI, E. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 162–167, 2016.

DESMOND, C.; ROSS, R. P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1003–1011, 2002.

DE VUYST, L.; FALONY, G.; LEROY, F. Review: Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, p. 75–78, 2008.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n.10, p. 1685- 1716, 2016.

DICK, L. M. T.; ENDO, A. Taxonomic status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key characteristics to differentiate species, **South African Journal of Enology and viticulture**, v. 30, n.1, 2009

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, 2009.

DOHERTY, S. B.; AUTY, M. A.; STANTON, C.; et al. Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 8, p. 713–728, 2012.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 3, p. 510–521, 2008.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. **Meat Science**, v. 69, p. 307-317, 2005.

DUBEY, R.; SHAMI, T.C.; BHASKER RAO, K.U. Microencapsulation Technology and Applications. **Defence Science Journal**, v. 59, p. 82-95, 2009.

DUBEY, V.; GOSH, A. R.; BISHAYEE, K; KHUDA-BUKHSH, A. R.. Appraisal of the anti-cancer potential of probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4 against colon cancer: In vitro and in vivo approaches. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 66–79, 2016.

ECKERT, C.; SERPA, V. G.; FELIPE DOS SANTOS, A. C.; et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 176–183, 2017.

ENNIS, J.M.; JESIONKA, V. The power of sensory discrimination methods revisited. **Journal of Sensory Studies**, Trumbull, v. 26, n. 5, p. 371-382, 2011.

FABIAN, C.B.; HUYNH, L.H.; JU, Y.H. Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. **Food Science and Technology**, v.43, p. 375–379, 2010.

FABIAN, C.; JU, Y. A review on rice bran protein: Its properties and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 9, p 816-827, 2011.

FAO. Probiotics in food. **Food and Nutrition Paper**, v. 85, p. 71, 2001.

FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)> Acesso em: 23/04/2017.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.103-112, 2008.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; PINTO, S.S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A.N.; MURAKAMI, F.S. Microencapsulation of *Bifidobacteria* by Spray Drying in the Presence of Prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012.

GARDINER, G.E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.A. E.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605–2615, jun. 2000.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B. O.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido e embalado a vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, 15, 113-133, 2013.

GOLLWITZER, E. S.; MARSLAND, B. J. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 141, n. 1, p. 32–39, 2014.

GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G. L.; ABRAHAM, A. G. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 556–560, 2011.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

HALIM, M.; MUSTAFA, N. A. M.; OTHMAN, M.; WASOH, H.; KAPRI, M. R.; ARIFF, A. B. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat, **LWT- Food Science and Technology**, v. 81, p. 210-216, 2017.

HE, Q.; GAO, Y.; YU, X.; LAURSEN, J. M.; XIAO, L.; LI, Y.; LI, L.; ZHANG, F.; FENG, Q.; LI, X.; YU, J.; LIU, C.; LAN, P.; YAN, T.; LIU, X.; YANG, H.; WANG, J.; MADSEN, L.; BRIX, S.; WANG, J.; KRISTIANSEN, K.; JIA, H. Two distinct metacommunities characterize the gut microbiota in crohn's disease patients. **Gigascience**, v.6, n.7, p. 1-11, 2017.

HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells, **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 309-316, 2010.

ILHA, E. C.; DA SILVA, T.; LORENZ, J. G.; DE OLIVEIRA ROCHA, G.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food**

**Research and Technology**, v. 240, n. 5, p. 977–984, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 2008.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; et al. Microencapsulation techniques , factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 95-103, 2015.

KALSCHNE, D.L.; GEITENES, S.; VEIT, M.R.; SARMENTO, C.M.P.; COLLA, E. Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria in Ham by Nisin: A Model Approach. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 744–752, 2014.

KALSCHNE, D.L.; WOMER, R.; MATTANA, A.; SARMENTO, C.M.P.; COLLA, L.M.; COLLA, E. Characterization of the Spoilage Lactic Acid Bacteria In 'sliced Vacuum-Packed Cooked Ham'. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 173–181, 2015.

KATTI, D.; KRISHNAMURTI, N. Preparation of albumin microspheres by and improved process. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 231-242, 1999.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics : potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** , v. 15, p. 1–9, 2002.

KHEM, S.; SMALL, D. M.; MAY, B. K. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v. 190, p. 717–723, 2016.

KLINGBERG, T. D.; BUDDE, B.B.; The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p.157-159, 2006.

KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D.; DOLATOWSKI, Z. J. Probiotic meat products and human nutrition. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1761–1772, 2012.



KONOVALOV, V. I.; GATAPOVA, N. Z.; KUDRA, T. Drying of Liquid Dispersions—A Unified Approach to Kinetics and Modeling. **Drying Technology**, v. 21, n. 6, p. 1029–1047, 2003.

KOPPHOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. **Journal of The American Dietetic Association**, v. 101, n. 2, 2001

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **Internationa Dairy Journal**, v.13, p. 3-13, 2003.

KRUMMENAUER, E.P.; DE PARANHOS, G.O.; DA SILVA, J.F.; DA SILVA-BUZANELLO, R.A; KALSCHNE, D.L.; CORSO M.P.; CANAN, C. Salame tipo Milano com substituição parcial do toucinho por queijo mussarela. **Revista Cultivando o Saber**, v. 8, n. 2, p. 143-161, abril a junho de 2015.

LAM, P:L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. Review. **Journal of Controlled Release**. v. 178 , p. 25–45, 2014.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.270-285, 2006.

LIAO, L. K.; WEI, X. Y.; GONG, X.; et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 82–89, 2017.

LIU, H.; GONG, J.; CHABOT, D.; et al. Protection of heat-sensitive probiotic bacteria during spray-drying by sodium caseinate stabilized fat particles. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 459–467, 2015.

LIU, R.; HONG, J.; XU, X.; FENG, Q.; ZHANG, D.; GU, Y.; SHI, J.; ZHAO, S.; LIU, W.; WANG, X.; XIA, H.; LIU, Z.; CUI, B.; LIANG, P.; XI, L.; JIN, J.; YING, X.; WANG, X.; ZHAO, X.; LI, W.; JIA, H.; LAN, Z.; LI, F.; WANG, R.; SUN, Y.; YANG, M.; SHEN, Y.; JIE, Z.; LI, J.; CHEN, X.; ZHONG, H.; XI, H.; ZHANG, Y.; GU, W.; DENG, X.; SHE, B.; XU, X.; YANG, H.; XU, G.; BI, Y.; LAI, S.; WANG, J.; QI, L.; MADSEN, L.; WANG, J.; NING, G.; KRISTIANSEN, K.; WANG, W. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. **Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 859-868, 2017a.

LIU, L.; CHEN, P.; ZHAO, W.; et al. Effect of microencapsulation with the Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. **Food Control**, v.79, p. 44-49, 2017b.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465–470, 2011.

MARTÍN, M.J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M.A.; MORALES, M.E. Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, 2015.

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different Technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MINELLI, E. B.; BENINI, A. Microbial Ecology in Health and Disease Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 20, p. 180-183, 2008.

MOAL, V. L. L.; SERVIN, A.L. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, p. 167–199, 2014.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R. A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 164–169, 2006.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties:  $\alpha$ -Tocopherol microparticle preparation. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 387–396, 2012.

O'HARA, A.M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO**, v. 7, p. 688–693, 2006.

OKURO, P. K.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; LIBERAL, R. D. C. O.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, p. 96-103, 2013.

PAULO, F.; SANTOS, L. PT SC. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science & Engineering C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017.

PISPAN, S.; HEWITT, C. J.; STAPLEY, A. G. F. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. **Food and Bioprocess Processing**, v. 91, n. 4, p. 362–369, 2013.

PICOT, A. ; LACROIX, C. Production of Multiphase Water Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray drying Technology. **Journal of Food Science**, v.68, n.9, p.2693-270, 2003.

PIERUCCI, A. P. T. R.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Comparison of  $\alpha$ -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. **Journal of Microencapsulation**, v.24, n.3, p.201-213, 2007.

PRATA, A. S; SGARBIERI, V. C.; Obtention, chemical and nutritional characterization in vitro of bovine sérum proteins. **Food Science and Technology**, v. 5, 2005.

PRISCO, A. DE; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v.48, p.27-39, 2016.

RAJAM, R.; ANANDHARAMKRISHNAN, C. Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of food Engineering**, v. 166, p. 95-103, 2015.

RAMAN, M.; AMBALAM, P. KONDEPUDI, K. K.; PITHVA, S.; KOTHARI, C.; PATEL, A.; PURAMA, R. K.; DAVE, J. M.; VYAS, B. R. M. Potential of probiotics, prebiotics and synbiotics for management of colorectal cancer. **Gut Microbes**, v. 4, p. 181–192, 2013.

REID, A. A.; CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; FUSTIER, P.; VUILLEMARD, J. C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of food science**, v. 72, n. 1, p. 31–37, 2007.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, p. 123-132, 2009.

RODRIGUEZ-RESTREPO, Y. A.; GIRALDO, G. A.; RODRIGUEZ-BARONA, S. Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. **Food process engineering**, v. 40, 2017.

ROESSLER, E.B.; PANGBORN, R.M.; SIDEL, J.L.; STONE, H. Expanded statistical tables for estimating significance in paired preference, paired difference, duo-tro and triangle tests. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 3, p. 940–943, 1978.

RUBIO, R.; MARTÍN, B.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 55-60, 2014a.

RUBIO, R.; JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; GUARDIA, M. D.; GARRIGA, M. Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 937-942, 2014b.

RUBIO, R.; AYMERICH, T.; BOVER-CID, S.; GUARDIA, M. D.; ARNAU, J.; GARRIGA, M. Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299v and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. **LWT- Food Science e Technnology**, v. 54, n.1, p. 51-56, 2013.

RUIZ, J. N. **Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo Italiano**. 2011. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SAAD, S. M.I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SANTIVARANGKNA, C. KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying process for the industrial preservation stater cultures. **Biotechnol. Prog.** V. 23, p.302-315, 2007.

SCREMIN, F. R.; VEIGA, R. S.; CORSO, M. P.; et al. Synthesis and characterization of protein microcapsules for eugenol storage. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.1-8 2017.

SETH, D.; MISHRA, H. N.; DEKA, S. C. Effect of microencapsulation using extrusion technique on viability of bacterial cells during spray drying of sweetened yoghurt. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 802–807, 2017.

SHI, L.E.; LI, Z. H.; ZHANG, Z. L.; ZHANG, T. T.; YU, W. M.; ZHOU, M. L.; TANG, Z. X.. Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p.147-152, 2013.

SIDIRA, M.; GALANIS, A.; NIKOLAOU, A.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. **Food Control**, v. 42, P. 315-320, 2014.

SLONGO, A. P. et al. Modeling growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT- Food Science and Technology**, 42, 303-306, 2009.

SOMBOONSUB, S.; THAWORNCHINSOMBUT, S. Effect of rice bran protein and cassava starch ratio on physical, mechanical and structural properties of rice bran protein-cassava starch composite film. **J. Food Science Agric. Technol**, v. 1, n. 1, p. 63–67, 2015.

TANAKA, T.; LU, T.; YUASA, S.; YAMAURA, K. Structure and properties of poly ( vinyl alcohol )/ k -carrageenan blends. p. 1103–1108, 2001.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 1950–1958, 2009.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.

VASCONCELOS, L. M. **Microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* bg 112 com acrycoat® s100 para aplicação como probiótico em salame**. 2016. 125 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos).  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2016.

VEIGA, R. S. **Eugenol microencapsulado em carragena combinada com proteínas do leite, do farelo de arroz e albumina sérica bovina por atomização**. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira. 2015.

VERRUCK, S.; DE CARVALHO, M. W.; DE LIZ, G. R.; et al. Survival of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. **Small Ruminant Research**, v. 153, n. February, p. 48–56, 2017.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448 p. 427–434, 2007.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Viability of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**. v.93, p. 209– 217, jul. 2004.

WU, G.D.; CHEN, J., HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.Y.; KEILBAUGH, S.A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W.A.; Knight, R. Linking longterm dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, p. 105–108, 2011.

YANG, M. H.; YUAN, S. S.; CHUNG, T. W.; JONG, S. B.; LU, C. Y.; TSAI, W. C.; CHEN, W. C.; LIN, P. C.; CHIANG, P. W.; TYAN, Y. C. Characterization of Silk Fibroin Modified Surface: A Proteomic View of Cellular Response Proteins Induced by Biomaterials. **BioMed Research International**, p. 1-13, 2014.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; et al. Microencapsulated Lactobacillus rhamnosus GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, 2010.

YU, J.; FENG, Q.; WONG, S. H.; ZHANG, D.; LIANG, Q. Y.; QIN, Y.; TANG, L.; ZHAO, H.; STENVANG, J.; LI, Y.; WANG, X.; XU, X.; CHEN, N.; WU, W. K. K.; AL-AAMA, J.; NIELSEN, H. J.; KIILERICH, P.; JENSEN, B. A. H.; YAU, T. O.; LAN, Z.; JIA, H.; LI, J.; XIAO, L.; LAM, T. Y. T.; CHIEN, S.; CHENG, A. S.; WONG, V. W.; CHAN, F. K. L.; XU, X.; YANG, H.; MADSEN, L.; DATZ, C.; TILG, H.; WANG, J.; BRÜNNER, N.; KRISTIANSEN, K.; ARUMUGAM, M.; SUNG, J. J.; WANG, J. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. **Gut**, v. 66, n. 1, p. 70-78, 2017.

ZANJANI, M. A. K.; TARZI, B. G.; SHARIFAN, A.; et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 26, p. 5511–5517, 2012.